

Aus der Klinik für Urologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham

**Therapieversuche mit verschiedenen Nukleinsäurekonstrukten
gegen die Zielgene hTERT, Survivin und VEGF
als Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin
im Harnblasentumor-Mausmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Lena Blumhoff
aus Eutin
Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniela Hornung

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.06.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Einführung	5
1.2	Das Harnblasenkarzinom	5
1.2.1	Epidemiologie und Inzidenz.....	5
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren	6
1.2.3	Pathologie, Stadieneinteilung und Prognose.....	8
1.2.4	Klinik und Symptomatik	12
1.2.5	Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	13
1.3	Therapie des Harnblasenkarzinoms	15
1.3.1	Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms	15
1.3.1.1	Transurethrale Resektion (TUR).....	15
1.3.1.2	Indikation zur Nachresektion.....	15
1.3.1.3	Radikale Zystektomie	15
1.3.1.4	Intravesikale Chemotherapie	15
1.3.1.5	Immuntherapie.....	16
1.3.1.6	Therapie des Carcinoma in situ	16
1.3.2	Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms.....	16
1.3.2.1	Radikale Zystektomie	16
1.3.2.2	Transurethrale Resektion plus kombinierte Radiochemotherapie.	17
1.3.2.3	Adjuvante Chemotherapie	17
1.3.2.4	Chemotherapie bei Patienten mit Fernmetastasen und/oder Lymphknotenmetastasen	18
1.4	Cisplatin: Struktur und Wirkmechanismus	19
1.5	Molekulare Ursachen der Tumorentstehung und –progression	21
1.6	Synthetische Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung tumorrelevanter Gene	23
1.6.1	Antisense-Oligodesoxyribonukleotide: Struktur und Funktion.....	23
1.6.2	Small interfering RNAs: Struktur und Funktion	24
1.6.3	Potentielle klinische Anwendungen von AS-ODN und siRNAs.....	26
2	AUFGABENSTELLUNG	28
3	MATERIAL UND METHODEN	29

3.1 Materialien.....	29
3.1.1 Versuchstiere.....	29
3.1.2 Tumorzellen.....	30
3.1.3 Blasenkatheter.....	31
3.1.4 Koagulationsgerät und Koagulationselektroden	31
3.1.5 Sonstige Materialien	31
3.1.6 Anästhetika.....	32
3.1.7 Intraperitoneal applizierte Therapeutika.....	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Anästhesie.....	34
3.2.2 Kennzeichnung der Tiere.....	34
3.2.3 Rasur.....	35
3.2.4 Katheterisierung	35
3.2.5 Elektrokoagulation der Harnblase.....	35
3.2.6 Tumorzellinstillation in die Blase.....	36
3.2.7 Subkutane Tumorzellimplantation	36
3.2.8 Applikation der Therapeutika	36
3.2.9 Opferung der Mäuse.....	37
3.2.10 Archivierung der Befunde	37
3.2.11 Versuchsaufbau	37
3.2.11.1 <u>Versuch 1</u>	38
Etablierung eines orthotopen, humanisierten Harnblasentumor-	
Mausmodells	
3.2.11.2 <u>Versuch 2</u>	41
Etablierung eines subkutanen, humanisierten Harnblasentumor-	
Mausmodells	
3.2.11.3 <u>Versuch 3</u>	44
Therapieversuch und Dosisfindung mit intraperitoneal appliziertem	
Cisplatin im subkutanen Blasentumor-Mausmodell	
3.2.11.4 <u>Versuch 4</u>	45
Überprüfung des Effektes von intraperitoneal applizierten AS-ODN	
und siRNAs gegen die Targets hTERT, Survivin und VEGF als	
Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin im subkutanen	
Blasentumor-Mausmodell	

3.2.12 Statistik.....	48
4 ERGEBNISSE.....	50
4.1 Versuch 1	50
4.1.1 Tumoranwachsrate.....	50
4.1.2 Makrohämaturie	51
4.1.3 Palpation der Tumoren.....	51
4.1.4 Gewichtsverhalten.....	53
4.1.5 Überleben.....	54
4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	56
4.2 Versuch 2	56
4.2.1 Tumoranwachsrate.....	56
4.2.2 Tumorwachstum.....	56
4.2.3 Gewichtsverlauf.....	58
4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
4.3 Versuch 3	61
4.3.1 Gewichtsverhalten.....	61
4.3.2 Tumorwachstum.....	63
4.3.3 Überleben.....	65
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
4.4 Versuch 4	67
4.4.1 Therapie mit AS-ODN	67
4.4.2 Therapie mit siRNAs	69
4.4.3 Therapie mit AS-ODN plus Cisplatin	71
4.4.4 Therapie mit siRNAs plus Cisplatin	74
4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	77
4.4.6 Weiterführende zellbiologische und molekulare Untersuchungen	78
5 DISKUSSION	80
5.1 Tumormodelle.....	80
5.2 Chemotherapie mit Cisplatin.....	82
5.3 hTERT – ein Antitumortarget?	84
5.4 Survivin – ein Antitumortarget?.....	88
5.5 VEGF – ein Antitumortarget?	90
5.6 Nukleinsäurebasierte Geninhibition – AS-ODN vs. siRNA	92
5.7 Ausblick	95

6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	113
9	DANKSAGUNG	116
10	LEBENS LAUF	117
11	PUBLIKATIONEN.....	118

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Das Harnblasenkarzinom stellt die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung des Urogenitaltraktes dar und steht als Todesursache beim Mann an 7. und bei der Frau an 8. Stelle. Jedes Jahr erkranken nach den neuesten Schätzungen etwa 28.750 Menschen in Deutschland an einer Tumorerkrankung der Harnblase. [1]

Zur Senkung des erheblichen Progressionsrisikos dieser Karzinomentität kommen Chemotherapeutika zum Einsatz, die jedoch starke Nebenwirkungen verursachen können bzw. ungenügende langfristige Effekte aufweisen. In den letzten Jahren gewinnen molekulare Therapieansätze bei malignen Tumoren zunehmend an Bedeutung. Im Unterschied zur konventionellen Chemotherapie, bei der alle Zellen einer Toxizität ausgesetzt sind, versucht man, bei den molekular orientierten Therapieansätzen selektiv das Tumorzellwachstum zu hemmen.

Diese neuartige Therapieoption besteht in der gezielten Expressionshemmung von Genen, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil vermitteln. Hierfür könnten sich besonders synthetische Nukleinsäuren wie Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (AS-ODN) und small interfering RNAs (siRNAs) eignen. Mit diesen target-spezifischen Substanzen ergeben sich gegenüber der konventionellen Chemotherapie völlig neue Therapiestrategien. Hier steht die Forschung jedoch erst am Anfang. Der Einsatz dieser Substanzen ist bisher nur in Studienprotokollen sinnvoll und gerechtfertigt. [2]

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

3% aller bösartigen Tumore sind Harnblasenkarzinome.

Statistische Erfassungen aus dem Jahr 2008 beziffern die altersstandardisierte Harnblasenkarzinominzidenz in Deutschland mit 41,7/100 000 für Männer und mit 10,3/100 000 für Frauen für das Jahr 2004. [1]

Einem Anstieg der Inzidenz bis Anfang der 1990er-Jahre folgte ab deren Mitte eine bis heute anhaltende Trendumkehr. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Zahlen auch von geänderten histopathologischen Malignitätskriterien beeinflusst wurden. [3]

Bezogen auf alle Tumorneuerkrankungen liegt das Harnblasenkarzinom bei den Männern an 4. Stelle (9,3%) und bei den Frauen an 8. Stelle (3,6%). [1]

Die Erkrankungshäufigkeit steigt mit zunehmendem Lebensalter der Bevölkerung. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 71 Jahre bei Männern und 74 Jahre bei Frauen. [1]

In der Mehrzahl der Fälle (90%) geht das Karzinom aus dem Epithel der ableitenden Harnwege, dem Urothel, hervor. Seltener zu finden sind Plattenepithelkarzinome (5-6%) und Adenokarzinome (2%).

Bei 80% der Patienten wird initial ein nichtinvasiver Tumor diagnostiziert, bei den übrigen 20% findet sich ein bis in die Muskelschicht infiltrierendes Karzinom, das zum Zeitpunkt der Diagnose zu einem hohen Prozentsatz metastasiert ist. [4]

Die Prognose variiert stark nach dem Grad der Ausbreitung der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. Da die meisten Karzinome in einem lokal begrenzten Stadium entdeckt werden, liegt die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen bei 70% und für Männer bei 76%. Betrachtet man nur die invasiven Karzinome der Harnblase, so sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich ab. Sie liegt dann bei 57% für Männer und bei 53% für Frauen. [1]

Laut WHO verstarben im Jahre 2000 weltweit 132.432 Personen an einem Harnblasenkarzinom.

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Auch gegenwärtig ist trotz zunehmender Erkenntnisse die Ätiologie von 80% der Blasentumoren unbekannt.

Für die Entstehung von Urothelkarzinomen wird ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess angenommen, bei dem komplette bzw. inkomplette Karzinogene die maligne Transformation der Urothelzelle verursachen (Initiation) und proliferationsstimulierende Kokarzinogene in einem zweiten Schritt bzw. in mehreren Schritten das Tumorwachstum realisieren (Promotion).

Mit genetischen Untersuchungen wurden verschiedene chromosomale Veränderungen beim Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Demnach stellt der Verlust von Chromosom 9 ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorgenese dar. Man vermutet deshalb, dass auf diesem Chromosom ein nicht näher charakterisiertes Tumorsuppressorgen lokalisiert ist. Alterationen des p53-Tumorsuppressorgens auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) und des Retinoblastomgens auf Chromosom 13 sind mit einem Tumorprogress assoziiert. [4]

An der Entstehung des Harnblasenkarzinoms sind exogene und endogene Karzinogene sowie Entzündungsreaktionen mitbeteiligt.

Aromatische Amine vom Typ des 1-Naphthylamins, des 2-Naphthylamins, Benzidins, Dichlorbenzidins, 4-Aminobiphenyls, Orthodiamisidins und Orthotolidins induzieren bei exponierten Personen Harnblasenkarzinome und Papillome. Die Bedeutung des ebenfalls als Karzinogen verdächtigen 4,4-Methylenbis-(2-chloranilin) (MOCA), das dieser Stoffgruppe zugeordnet wird, ist noch unklar.

Aromatische Amine werden auf verschiedenen Stoffwechselwegen, vorzugsweise in der Leber, in letztlich karzinogen wirksame Substanzen umgewandelt. An den Abbaureaktionen beteiligt sind einerseits N-Azetylierungsprozesse mit nachfolgender N-Hydroxylierung, andererseits eine primäre N-Hydroxylierung mit nachfolgender N-Glucuronidbildung.

Beim Menschen unterliegt die Azetylierung kanzerogener Arylamine einer genetischen Variabilität, die das Risiko einer Harnblasentumorentstehung unter dem Einfluß aromatischer Amine wesentlich mitbestimmen könnte. Klinisch ließen sich diese Zusammenhänge bislang nicht darstellen. [3]

Etwa 1/3 aller Blasentumorerkrankungen sind mit Zigarettenkonsum korreliert. Das 2-4fach erhöhte Risiko der Tumorentstehung steigt wesentlich bei mehr als 20-jährigem Zigarettenkonsum und fällt bei Exrauchern erst nach 7-15 Jahren auf das Niveau von Nichtrauchern zurück. Es besteht zudem eine positive Korrelation zwischen Tumorinzidenz und Teergehalt sowie der Menge der konsumierten Zigaretten. [3]

Eine gesteigerte Blasentumorinzidenz findet sich infolge einer Exposition gegenüber Cyclophosphamid, bei Phenacetinabusus und nach Bestrahlung der Beckenregion.

Weitere mutmaßliche Karzinogene stellen Inhaltsstoffe der gerösteten Kaffeebohne dar.

Eigenständige Risikofaktoren stellen hoher Nitritgehalt im Trinkwasser, Haloalkane bei Trinkwasserchlorierung sowie chronische Entzündungszustände der Harnblase und Urinstase dar. Bei chronischen Entzündungszuständen dürften für die Tumorentstehung Nitrosamine verantwortlich sein, die von Bakterien wie E.coli, Proteus bzw. auch von Schistosoma haematobium gebildet werden können.

Die endemische Nephropathie kann ebenfalls mit einer Blasentumorbildung einhergehen. Verantwortlich gemacht werden Mykotoxine, die von saprophytischen Pilzen auf Nahrungsmitteln gebildet werden. [3]

Mehrheitlich muss anstelle einer einzigen Noxe kausal ein multifaktorielles Geschehen im Sinne einer Plurikarzinogenese durch Zusammenwirken kompletter bzw. inkompletter initiiierender und promovierender Karzinogene vermutet werden. Tierexperimentelle Untersuchungen unterstreichen die formalgenetische Entwicklung der Mehrzahl aller Harnblasentumoren über mehrstufig ablaufende, lange Zeit beanspruchende Prozesse mit Durchlaufen verschiedener, aufeinander folgender Transformationsstadien. [3]

1.2.3 Pathologie, Stadieneinteilung und Prognose

Zu den wichtigsten benignen epithelialen Tumoren der Harnblase zählen das Urothelpapillom und das invertierte Papillom, das durch ein endophytisches Wachstum gekennzeichnet ist. Ihr Epithel unterscheidet sich nicht von dem des normalen Urothels.

Beide Tumoren sind benigne, zeigen aber ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Blasenkarzinoms: Rezidive nach Operationen entstehen in etwa 40% der Fälle, in der späteren Folge entwickeln sich in bis zu 2-10% der Fälle invasive Tumoren. [5]

Maligne Tumoren der Blase leiten sich zu 90% vom Urothel ab. Seltener sind Plattenepithel- und Adenokarzinome. Ein besonderes Charakteristikum des Urothelkarzinoms ist die Multizentrität, d.h. das synchrone oder metachrone Auftreten von mehreren Tumoren in der Harnblase oder darüber hinaus in Nierenbecken oder Ureteren.

Morphologisch unterscheidet man bei den Urothelkarzinomen papilläre (exophytische) und solide Karzinome. Entsprechend der unterschiedlichen Wachstumsformen nimmt man an, dass die Tumoren sich auf zwei Wegen entwickeln.

Der nichtinvasive papilläre Tumor kann invasiv werden und enthält dann noch exophytische Anteile. Eine Vorstufe ist wahrscheinlich eine Verdickung des flachen Urothels (Hyperplasie).

Das Carcinoma in situ wird bei Invasion zu einem soliden Tumor.

Zur Beschreibung des Tumorstadiums des Primärtumors werden in der prätherapeutischen klinischen Klassifikation (TNM) und in der postoperativen Klassifikation (pTNM) Ausdehnung des Primärtumors (T), Status der drainierenden Lymphknoten (N) und das Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen (M) beschrieben. [5]

TNM-Klassifikation der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC) in der überarbeiteten Version von 2003:

T – Primärtumor	
(p)TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
(p)T0	Kein Anhalt für Primärtumor
(p)Ta	nichtinvasives papilläres Karzinom
(p)Tis	Carcinoma in situ
(p)T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
(p)T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskelschicht (innere Hälfte)
(p)T2b	Tumor infiltriert äußere Muskulatur
(p)T3a	Tumor infiltriert mikroskopisch perivesikales Fettgewebe
(p)T3b	Tumor infiltriert makroskopisch perivesikales Fettgewebe (extravesikaler Tumor)
(p)T4a	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
(p)T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	solitär; größte Ausdehnung befallener Lymphknoten: 2 cm oder weniger
N2	multipel; größte Ausdehnung: mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm
N3	solitär/multipel; größte Ausdehnung: mehr als 5 cm
M – Fernmetastasen	
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM- (klinische) und pTNM-(pathologische) Klassifikation des Harnblasenkarzinoms [3]

Im klinischen Alltag unterscheidet man zwischen oberflächlich wachsenden Tumoren (nicht infiltrierend, pTa, Cis, pT1) und invasiv wachsenden Tumoren (\geq pT2). [4]

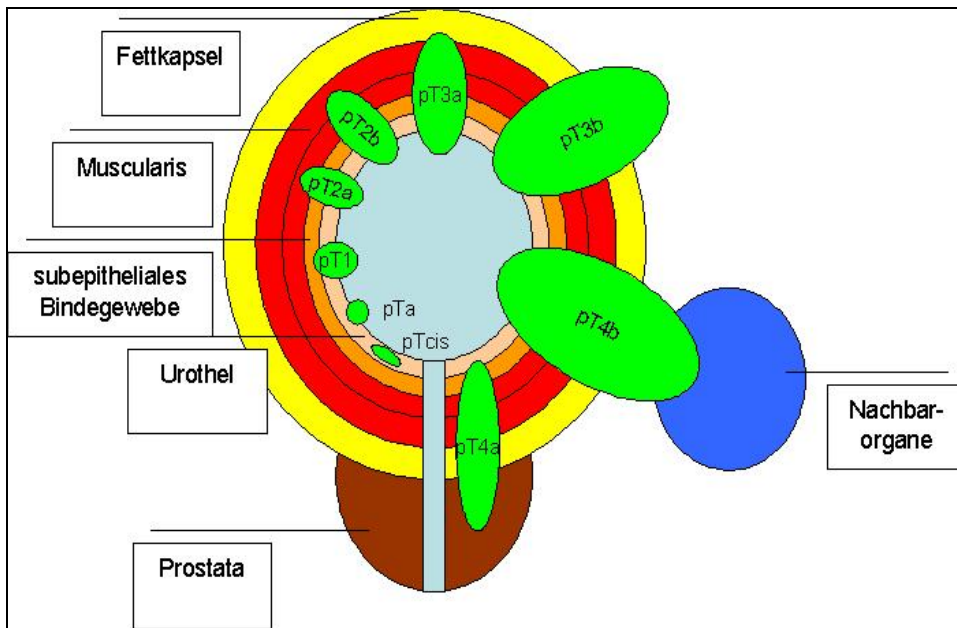


Abbildung 1: T-Stadieneinteilung von Blasen Tumoren

aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Harnblasenkrebs> (Oktober 2008)

Das histopathologische Grading gibt Auskunft über den Differenzierungsgrad eines Tumors. Urothelkarzinome der Harnblase wurden über mehrere Jahrzehnte hinweg nach der im Jahre 1973 publizierten Klassifikation der WHO in drei Malignitätsgrade (G1, G2 und G3) unterteilt. Die neue WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2004 unterteilt das nicht-muskelinvasive Urothelkarzinom anhand des histologischen Bildes und immunhistochemischer Analysen in einen „low grade“- beziehungsweise „high grade“-Tumor. Genetisch stabile Tumoren werden als „low grade“ (niedrig maligne) und genetisch instabile Tumoren als „high grade“ (hoch maligne) bezeichnet. Ein urothelialer Tumor mit leichter Schichtungsstörung und damit verbundenem ungeordnetem Erscheinungsbild wird als nichtinvasives Urothelkarzinom „low grade“ befundet. Eine Zell- und Kernpolymorphie sowie eine damit verbundene Schichtungsstörung eines papillären Tumors, die größer ist und der des invasiven Tumors entspricht, bezeichnet man als nichtinvasives papilläres Karzinom „high grade“. Dabei werden papilläre hochdifferenzierte Tumoren ohne Schichtungsstörung von den papillären Karzinomen als „papilläre urotheliale Neoplasie von niedrig malignem Potenzial“ (PUNLMP) abgegrenzt.

Deletionen und Aneuploidisierung der Tumorzellen können durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden im Tumorgewebe und auch im Urin nachgewiesen werden. Diese Technik wird als Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bezeichnet. Sie ermöglicht es, genetische Veränderungen in Zellen, die zytologisch noch normal aussehen, nachzuweisen. Durch die Methoden der Molekularpathologie konnte gezeigt werden, dass trotz überwiegend exogener Ursache des Urothelkarzinoms fast jeder Patient eine andere p53-Mutation aufweist. [5]

Die Prognose des Patienten hängt sowohl vom histologischen Malignitätsgrad als auch vom Tumorstadium ab. Patienten mit pTa-Karzinomen haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80-90%. Die Rezidivrate erreicht 60%. Eine Tumorprogression tritt in 10% der Fälle auf. Tumoren mit Malignitätsgrad 3 haben eine deutlich höhere Rezidiv- und Progressionsrate.

PT1-Karzinome werden noch zu den oberflächlichen Karzinomen gerechnet. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70%.

Das flache Carcinoma in situ birgt zu 80% das Risiko, ein solides, invasives Karzinom (Grad 3) zu entwickeln.

Bei Vorliegen einer Infiltration der Blasenmuskulatur verschlechtert sich die Prognose rasch. Von den T3- und T4-Karzinomen zeigen 40% eine regionäre Lymphknotenmetastasierung. Todesursachen sind Metastasierung und Rezidive im kleinen Becken, die Ureteren und Rektum stenosieren. [5]

1.2.4 Klinik und Symptomatik

Das häufigste Symptom des Harnblasenkarzinoms ist in ca. 80% der Fälle die schmerzlose Makrohämaturie. In 30% der Fälle sind Blasenkarzinome mit zystitischen Beschwerden wie Dysurie, Pollakisurie und Urgesymptomatik vergesellschaftet. Bei 20% der Patienten wird die Diagnose zufällig aufgrund einer Mikrohämaturieabklärung gestellt.

Bei fortgeschrittenen Blasenkarzinomen können weitere Symptome auftreten, die durch die lokale Infiltration und Metastasierung des Tumors verursacht werden. Dazu zählen:

- einseitige oder beidseitige Flankenschmerzen bei Harnstauungsniere durch Ostieninfiltration,
- Restharnbildung, Harnverhalt oder Blasentamponade bei Verlegung des Blasenauslasses oder Bildung von Blutkoageln,
- Stuhlunregelmäßigkeiten wie Obstipation oder Diarrhoe bei Rektuminfiltration,
- Lymphödeme der unteren Extremitäten durch lymphogene Metastasierung im kleinen Becken sowie
- Knochenschmerzen, Husten, Auswurf oder Veränderung der Leberenzyme bei hämatogener Metastasierung. [4]

1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Die Anamnese beinhaltet die Frage nach Änderungen des Miktionsverhaltens wie Hämaturie, Dysurie oder Pollakisurie. Zudem werden Risikofaktoren abgeklärt, z. B. ein Nikotinabusus oder eine beruflich bedingte Kanzerogenexposition.

Die klinische Untersuchung beinhaltet die Palpation von Nierenlager, Abdomen, Harnblase und äußerem Genital. Beim Mann wird die Prostata rektal, bei der Frau das innere Genital bimanuell vaginal untersucht. [4]

Standard in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ist die Zystoskopie. Sie ermöglicht den Nachweis von Blasenkarzinomen mit einer Sensitivität von über 90%. [7] Die Diagnostik des Carcinoma in situ ist in der Weißlichtendoskopie jedoch nur unzureichend; ungefähr 30% dieser flachen Urothelläsionen werden dabei übersehen. Mithilfe der photodynamischen Diagnostik (PDD), bei der intravesikal der Farbstoff 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) bzw. dessen Derivate appliziert werden, kann diese Tumorentität wesentlich effizienter diagnostiziert werden. [8]

Die Diagnose wird dann mittels fraktionierter Gewebeentnahme histopathologisch gesichert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, in gleicher Sitzung die transurethrale Resektion (TUR) des Tumors vorzunehmen. [4]

Bei Verdacht auf Vorliegen eines Harnblasentumors wird der Nativurin auf pathologische Bestandteile untersucht. Zur Diagnostik von Mikrohämaturie und Harnwegsinfekten sollten Urinteststreifen eingesetzt und eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt werden. Die Zytologie zählt in Ergänzung zur Zystoskopie zur grundlegenden Diagnostik der Harnblasenkarzinomerkrankung. Ziel der urinzytologischen Diagnostik ist in erster Linie die Detektion von „high risk“-Urothelkarzinomen. [4]

Uringebundene Markersysteme sollen die Detektionsrate steigern, können jedoch derzeit die Zystoskopie in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms (noch) nicht ersetzen. [3]

Zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms gehört außerdem die Sonographie zur Detektion exophytischer Blasentumoren, einer eventuellen Lymphknotenvergrößerung oder einer hepatischen Filiarisierung.

Das Ausscheidungsurogramm gibt Auskunft über Funktion und Morphologie der harnableitenden Wege. In ca. 3% der Fälle können Urothelkarzinome auch im oberen Harntrakt auftreten, folglich wird meist präoperativ ein Ausscheidungsurogramm angefertigt. [9]

Bei gesichertem Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms, insbesondere bei lokal fortgeschrittenen Tumorstadien, erfolgen CT-, MRT- und Röntgen-Untersuchungen, um die Ausbreitung des Tumors abschätzen und das Vorhandensein von Metastasen abklären zu können. [4]

1.3 Therapie des Harnblasenkarzinoms

1.3.1 Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms

1.3.1.1 Transurethrale Resektion (TUR)

Die Therapie des nichtinvasiven Urothelkarzinoms besteht in der transurethralen Resektion, wobei bei pT1-Tumoren und bei „high grade“-Tumoren die Indikation zur Nachresektion gegeben ist. [9]

1.3.1.2 Indikation zur Nachresektion

Die Indikation zur erneuten TUR besteht bei pT1-Tumoren und bei pTa-Tumoren, bei denen eine komplette Tumorsektion zunächst nicht möglich war. Wurde bei der Erstresektion ein Ta/T1-„high grade“-Karzinom diagnostiziert, sollte auch dieser Befund nachreseziert werden. [9]

1.3.1.3 Radikale Zystektomie

Die Indikation für eine radikale Zystektomie ist bei T1G3 („high grade“-)Tumoren gegeben. Allerdings ist auch die BCG-Therapie eine sinnvolle Option bei dieser Tumorentität, so dass derzeit nicht klar festgelegt werden kann, welcher Patient mit einem T1G3-Tumor früh zystektomiert werden muss. [9]

1.3.1.4 Intravesikale Chemotherapie

Durch topische Anwendung von Thiotepa, Mitomycin, Doxorubicin und Epodyl kann bei nicht komplett resezierten, nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren eine Minderung der Rezidivrate erzielt werden. Eine Metaanalyse der „European Organisation for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC) und des „Medical Research Council“ (MRC) zeigt im Vergleich zur alleinigen TUR jedoch keinen Einfluss der topischen Therapie auf Tumorprogression, Fernmetastasen, Überleben und Tod. [10]

Empfohlen werden eine unmittelbar postoperative Frühinstillation sowie die wöchentliche Zytostatikagabe über 6 Wochen (Induktion). Danach erfolgt eine monatliche Therapie für ein halbes Jahr.

1.3.1.5 Immuntherapie

Einsatz finden die Immuntherapeutika α -Interferon und Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Interferon wirkt immunmodulierend und antiproliferativ. Die Instillation von BCG nach erfolgter TUR zeigt eine Senkung der Rezidiv- und Progressionsrate im Vergleich zur alleinigen TUR. [11]

1.3.1.6 Therapie des Carcinoma in situ

Das derzeitige Therapiekonzept beim Carcinoma in situ sieht zunächst eine intravesikale Behandlung mit BCG vor. Ist innerhalb von 3 Monaten eine komplette Remission nicht zu erreichen, sollte eine wiederholte Instillation oder eine Zystektomie angeschlossen werden. [9]

1.3.2 Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

1.3.2.1 Radikale Zystektomie

Behandlung der Wahl beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom ist die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie. Beim Mann umfasst dies die Entfernung von Harnblase, Prostata, Samenblasen, proximalen Samenleitern und distalen Harnleitern sowie der Harnröhre bei Tumorbefall. Bei der Frau werden außer der Harnblase die distalen Harnleiter und, bei Tumorbefall, die Harnröhre mitentfernt. Wegen möglicher Tumordinfiltration wird auch die Mitnahme des Uterus und des ventralen proximalen Scheidendrittels empfohlen. Die gleichzeitige Ovariectomie ist heute nicht mehr Standard. [9]

1.3.2.2 Transurethrale Resektion plus kombinierte Radiochemotherapie

Weder die alleinige transurethrale Resektion noch die ausschließliche Radio- oder Chemotherapie erzielen ausreichend zufriedenstellende Ergebnisse, um eine echte Alternative zur Zystektomie darzustellen. Die Resultate lassen sich jedoch durch Kombination dieser Therapiemöglichkeiten untereinander deutlich verbessern.

Ist aufgrund der Infiltrationstiefe eine komplette Tumorsektion gegebenenfalls auch durch Nachresektion möglich, sollte diese vor einer Radiochemotherapie immer angestrebt werden.

Die Chemotherapie hat zwei Ziele. Zum einen soll durch die radiostabilisierende Wirkung von Substanzen wie Cisplatin und 5-Fluorouracil eine lokal höhere Remissions- und Kontrollrate erreicht werden. Zum anderen erhofft man sich, die zum Diagnosezeitpunkt in bis zu 50% der Fälle bereits vorhandene Tumorzellstreuung bei muskelinvasiven Tumoren möglichst effektiv behandeln zu können. [9]

Der bislang einzige randomisierte Vergleich ergab eine signifikante Verbesserung der lokalen Kontrolle, wenn die Radiotherapie mit einer cisplatinhaltigen Chemotherapie kombiniert wurde. [12]

1.3.2.3 Adjuvante Chemotherapie

Das Ziel der adjuvanten Chemotherapie besteht darin, den Erfolg vorangegangener lokaler Therapiemaßnahmen zu konsolidieren und vorhandene, nicht sichtbare Tumorresiduen zu erfassen. Eine Arbeit von Skinner et al., welche die alleinige Zystektomie versus Zystektomie plus Cyclophosphamid, Adriamycin und Cisplatin verglich, zeigte nach 5 Jahren ein krankheitsfreies Überleben von 34 versus 51% und ein Gesamtüberleben von 39 versus 44%. [13]

Die Indikation für eine adjuvante Chemotherapie ergibt sich bei lokal fortgeschrittenem Karzinom ($\geq pT3$) oder bei intraoperativ nachweisbarem Lymphknotenbefall (N1). Die Angaben über den Nutzen der adjuvanten Chemotherapie sind allerdings kontrovers. [4]

1.3.2.4 Chemotherapie bei Patienten mit Fernmetastasen und/oder Lymphknotenmetastasen

Bis vor einigen Jahren stellte die Polychemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (MVAC) die Standardtherapie des fortgeschrittenen, muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms dar. Bei gleicher Effektivität und geringeren Nebenwirkungen wird heute eine Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Cisplatin favorisiert.

Gemcitabin führt sowohl bei nicht vorbehandelten als auch bei cisplatinrefraktären Patienten in der Monotherapie zu Gesamtremissionen von 23-50%. Durch Kombination mit Cisplatin konnten in klinischen Phase-II-Studien maximale Remissionsraten von 55 -76% bei einer medianen Überlebenszeit von 12,5 -14,4 Monaten erzielt werden. [3]

Bei den Taxanen Paclitaxel und Docetaxel handelt es sich ebenfalls um neuentwickelte, wirksame Tumortherapeutika. Paclitaxel und Docetaxel führen zu Gesamtremissionen von 42% bzw. 31% bei nicht vorbehandelten Patienten. Paclitaxel in Kombination mit Cisplatin führt zu Remissionsraten von 50 -72% bei einer medianen Überlebenszeit von 14,4 Monaten. [3]

Die Remissionsraten und -zeiten von Gemcitabin und Taxanen sind mit denen der MVAC-Behandlung vergleichbar, das jedoch bei günstigerem Toxizitätsprofil. Zusätzlich ermöglichen die neu zugelassenen Substanzen eine erfolgversprechende „second line“-Behandlung von MVAC-Versagern. [3]

1.4 Cisplatin: Struktur und Wirkmechanismus

Cisplatin ist ein planares Molekül, in dem zweiwertiges Platin koordinativ zwei Amino-Gruppen und zwei Chlor-Atome gebunden hat.

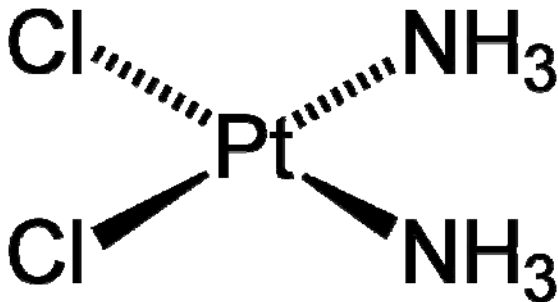


Abbildung 2: Strukturformel von Cisplatin

Ähnlich wie die alkylierenden Zytostatika bildet Cisplatin Brücken zwischen und innerhalb von DNA-Molekülen aus. Zunächst werden die beiden Chlor-Atome durch H_2O -Moleküle ersetzt. Dies geschieht vor allem intrazellulär, weil hier die Chlor-Konzentration niedriger ist als extrazellulär. Im nun zweifach positiv-geladenen Komplex bindet das reaktive Platin unter Mitnahme der beiden Amino-Gruppen an Nukleinsäure-Untereinheiten und beeinträchtigt so den DNA-Stoffwechsel. [14]

Bevorzugt koordiniert Cisplatin an die N7-Stickstoffatome des Guanins. Prinzipiell gibt es vier bifunktionelle Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin an Guanin in doppelsträngiger DNA:

1. Chelatkomplexbildung durch Stickstoff- und Sauerstoffkoordination an einer Base,
2. Verknüpfung zweier Nukleobasen eines DNA-Strangs („intrastrand cross-linking“),
3. Quervernetzung zweier verschiedener DNA-Stränge („interstrand cross-linking“) und
4. Verknüpfung der DNA mit einem Protein.

Zu den beiden häufigsten Adduktbildungen *in vivo* zählen die Verknüpfung zweier benachbarter Guaninbasen („1,2-intrastrand d(GpG) cross-linking“, 65 %) sowie die „1,2-intrastrand d(ApG)“-Verknüpfung (25 %). [15,16] Durch die 1,2-d-GpG-

Koordination des Cisplatins kommt es zur Verdrillung der DNA an dieser Stelle und diese kann vom Reparatursystem des Körpers, den HMG-Proteinen (High Mobility Group), erkannt werden. Zusätzlich wird die DNA-Replikation verhindert. [15]

Cisplatin bewirkt zudem durch Hemmung eines Zellreparaturmechanismus eine Radiosensitivierung.

Die intrazelluläre Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist von großer Bedeutung, da diese gewöhnlich letal für die Zelle sind. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in eukaryontischen Zellen erfolgt zum einen durch den Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung („non-homologous end-joining“, NHEJ), zum anderen durch die homologe Rekombination („homologous end-joining“, HEJ). Störungen im NHEJ-Mechanismus führen zu einer Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung. Die Radiosensitivierung von Säugetierzellen nach Behandlung mit Cisplatin ist auf eine Hemmung dieses NHEJ-Mechanismus zurückzuführen. [17]

Die antitumorale Wirkung Cisplatins beruht, neuesten Studien zufolge, zusätzlich auf der Hochregulation eines Gewebeinhibitors der Matrix-Metalloproteinasen.

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind verantwortlich für Ab- und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix. Tumorgewebe, die MMP-2, MMP-9 und MMP-14 sezernieren, neigen besonders zur Metastasierung, da die exprimierten Matrix-Metalloproteinasen den Abbau von Basalmembranen und den Aufbau tumoreigener Blutgefäße unterstützen. Neben den MMPs existieren so genannte Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen („Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“, TIMP). Diese Proteine hemmen die Aktivität der MMPs durch spezifische Bindung an deren katalytische Zentren. Dadurch kann der Ab- und Umbau des Gewebes durch MMPs moduliert werden. Bislang sind vier verschiedene TIMPs bekannt. Sie werden als lösliche Proteine in die extrazelluläre Matrix sezerniert.

Ramer et al. zeigten, dass Cisplatin bei humanen Zervixkarzinomzellen zu einer Hemmung der Zellinvasion führte. Dieser Effekt war auf eine Hochregulation von TIMP-1 zurückzuführen. Die Beeinflussung der Expression von TIMP-1 scheint

insbesondere für die antimetastatischen Eigenschaften von Cisplatin verantwortlich zu sein. [18]

1.5 Molekulare Ursachen der Tumorentstehung und -progression

Die Tumorentstehung ist durch eine Vielzahl molekularer Alterationen bedingt. Zu den wesentlichen Mechanismen gehören die verringerte Apoptoserate tumoraler Zellen, die Angiogenese und die Immortalität der Tumorzellen.

Einen frühen Schritt innerhalb der Tumorgenese stellt die Aktivierung der Telomerase dar, wodurch Zellen immortalisiert werden. Für das Harnblasenkarzinom wurde eine tumorspezifische Telomeraseaktivität nachgewiesen, die im normalen Urothel nicht zu finden ist. [19,20] Harnblasenkarzinomzellen erlangen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit durch frühe Aktivierung der Telomerase.

Die humane Telomerase besteht als RNA-abhängige reverse Transkriptase aus verschiedenen Proteinuntereinheiten und einer RNA-Komponente, der humanen Telomerase-RNA (hTR). Die DNA-Synthese wird von hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) katalysiert. [21]

Die Telomerase fördert das Tumorwachstum auf zwei verschiedenen Ebenen: zum einen hat sie eine telomerverlängernde Funktion, zum anderen schützt sie die Chromosomenenden. Durch dieses „Telomer-Capping“ induziert sie Überlebens- und Proliferationssignale. [22,23]

Ein weiteres Protein, welches beim Harnblasenkarzinom vermehrt produziert wird, ist Survivin. Hierbei handelt es sich um ein Antiapoptoseprotein. Survivin gehört der Genfamilie „Inhibitor of Apoptosis“ (IAP) an. [25]

Da Survivin im adulten Körper im Wesentlichen nur in Malignomen und nicht im Normalgewebe zu finden ist, und da es eine große Bedeutung für die gestörte Apoptoseregulation in transformierten Zellen aufweist, wurde Survivin schon kurz nach seiner Entdeckung als potentieller Biomarker für die Diagnostik und Prognose von Krebserkrankungen sowie als mögliches Target in der

Tumortherapie vorgeschlagen. [26] Die Mechanismen der antiapoptotischen Funktion von Survivin sind jedoch noch nicht vollständig erforscht. Survivin soll den Mitochondrien-abhängigen, sog. intrinsischen Apoptoseweg antagonisieren. Die inhibierende Wirkung von Survivin auf die Apoptosekaskade scheint über eine Inaktivierung der Zelltodprotease Caspase-9 vermittelt und von dem Kofaktor „Hepatitis B virus x interacting protein“ (HBXIP) abhängig zu sein. [27]

Eine Überexpression von Survivin in Harnblasentumorzellen ist assoziiert mit einer erhöhten Rezidivquote. [28] Die selektive Expression von Survivin in Tumorzellen führte zu der Annahme, dass dieses Protein als fremd erkannt wird und somit auch eine Immunantwort auslösen könnte. [29]

Der Anschluss des Tumors an das Blutgefäßsystem wird durch eine vermehrte Produktion von Angiogenesefaktoren, wie z.B. des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), gewährleistet. [24] VEGF stellt eine Familie von Proteinen dar, welche unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Unterschieden werden VEGF-A bis VEGF-F, sowie das PlGF (Placental Growth Factor).

Alle Mitglieder der VEGF-Familie bewirken eine zelluläre Antwort, indem sie an eine Tyrosinkinase, den VEGF-Rezeptor (VEGFR), binden und so das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weiterleiten. Die Rezeptoren dimerisieren nachdem sie VEGF gebunden haben und phosphorylieren sich dann gegenseitig. Damit werden sie aktiv und leiten das Signal weiter. Die Produktion von VEGF wird angeregt, wenn Zellen nicht genug Sauerstoff erhalten. Diese unterversorgten Zellen produzieren Transskriptionsfaktoren, sog. „Hypoxia inducible factors“ (HIF), was eine Ausschüttung von VEGF und schließlich die Angiogenese nach sich zieht.

In vitro stimuliert VEGF die Teilung und Migration von Endothelzellen. [24]

1.6 Synthetische Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung tumorrelevanter Gene

Die Aktivierung und Überexpression von Genen, die an der Tumorgenese und -progression beteiligt sind, stellt einen potentiellen Angriffspunkt neuartiger Therapeutika auf molekularer Grundlage dar. Durch Inhibition dieser Gene soll das Tumorwachstum reduziert werden. Durch Auswahl eines tumorspezifischen Targetgens sollen außerdem der Einfluss der Behandlung auf gesunde Zellen minimiert und therapeutische Nebenwirkungen reduziert werden. Eine Möglichkeit dieser spezifischen Geninhibition stellt die Therapie mit synthetischen Nukleinsäurekonstrukten wie Antisense- Oligodesoxyribonukleotiden (AS-ODN) oder small interfering RNAs (siRNAs) dar.

1.6.1 Antisense-Oligodesoxyribonukleotide: Struktur und Funktion

AS-ODN sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu einer entsprechenden Target-mRNA ausgewählt wird. Die sequenzspezifische Hybridisierung der synthetischen Konstrukte mit ihrer Target-mRNA über Watson-Crick-Basenpaarung vermittelt die Inhibition der Genexpression.

Wirkmechanismen von AS-ODN sind:

1. Hemmung der Transkription durch sequenzspezifische Bindung an genomische DNA,
2. Modulation der RNA-Prozessierung (Inhibition von Polyadenylierung und 5'-Capping, Blockierung des Spleißvorgangs, Behinderung des mRNA-Transportes ins Zytoplasma,
3. Hemmung der Translation durch sterische Blockade der Ribosomen,
4. Spaltung der Target-mRNA in AS-ODN-mRNA-Hybridmolekülen durch die Endonuklease RNase H. [30]

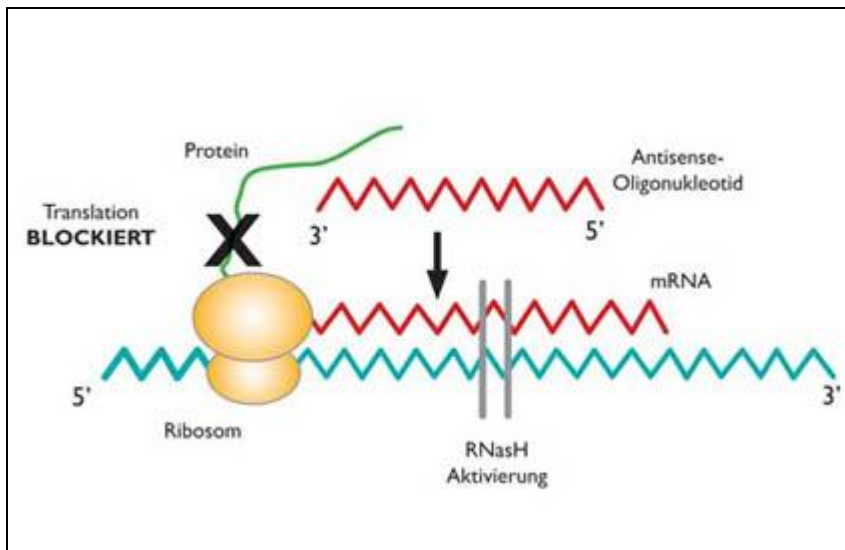


Abbildung 3: Wirkmechanismen der AS-ODN

aus: www.journalonko.de/aktuellview.php?id=1428 (September 2008)

Per se kann jedes bei Tumoren überexprimierte Gen durch Antisense-Wirkstoffe inhibiert und herunterreguliert werden.

Bislang erhielten nur wenige AS-ODN-Medikamente die Zulassung. Eines dieser Medikamente ist Fomivirsen (Vitravene). Dabei handelt es sich um ein AS-ODN, das zur Verhinderung einer Cytomegalie-Virus-induzierten Retinitis direkt in das Auge injiziert wird. [31] Weitere AS-ODNs befinden sich derzeit in klinischen Studien (siehe dazu Kapitel V).

1.6.2 Small interfering RNAs: Struktur und Funktion

Das Phänomen der RNA-Interferenz beschreibt die sequenzspezifische posttranskriptionelle Geninhibition durch doppelsträngige RNA. Es kommt dabei zu einer sequenzspezifischen Spaltung einzelsträngiger Ziel-mRNA mit entsprechender Sequenzhomologie zur doppelsträngigen RNA. Zuerst beschrieben wurde dieser Prozess 1999 in den Nematoden *Caenorhabditis elegans*.

Der natürliche RNA-Interferenz-Mechanismus dient dem Schutz des zellulären Genoms vor fremden genetischen Elementen, wie z.B. RNA-Viren oder Transposons. siRNAs entstehen natürlicherweise durch zelleigene Enzymsysteme (Dicer) als Spaltprodukte aus langen doppelsträngigen RNAs. Bei diesen kurzen siRNA-Duplexen ist die Länge von 21-23 Nukleotiden und ein 2 Nukleotide langer Einzelstrangüberhang am 3'-Terminus beider Ketten charakteristisch.

Die siRNA-Duplexe können effektiv zur Degradation von mRNA führen. Die siRNA-Sequenz determiniert dabei die Detektion sequenzhomologer mRNA-Areale und deren Degradation durch Aktivierung zelleigener RNasen. Der exakte Mechanismus dieser Degradation ist noch nicht bekannt. Die endonukleolytische Target-RNA-Spaltung durch einen Ribonuklein-Komplex, den sogenannten „RNA induced silencing complex“ (RISC), gilt jedoch als relativ gesichert. Der RISC-Komplex verwendet die siRNA-Sequenz als Leitsequenz zur Erkennung sequenzhomologer mRNA und induziert nachfolgend deren Abbau, wodurch letztlich die Zielproteinexpression spezifisch gehemmt wird. [32]

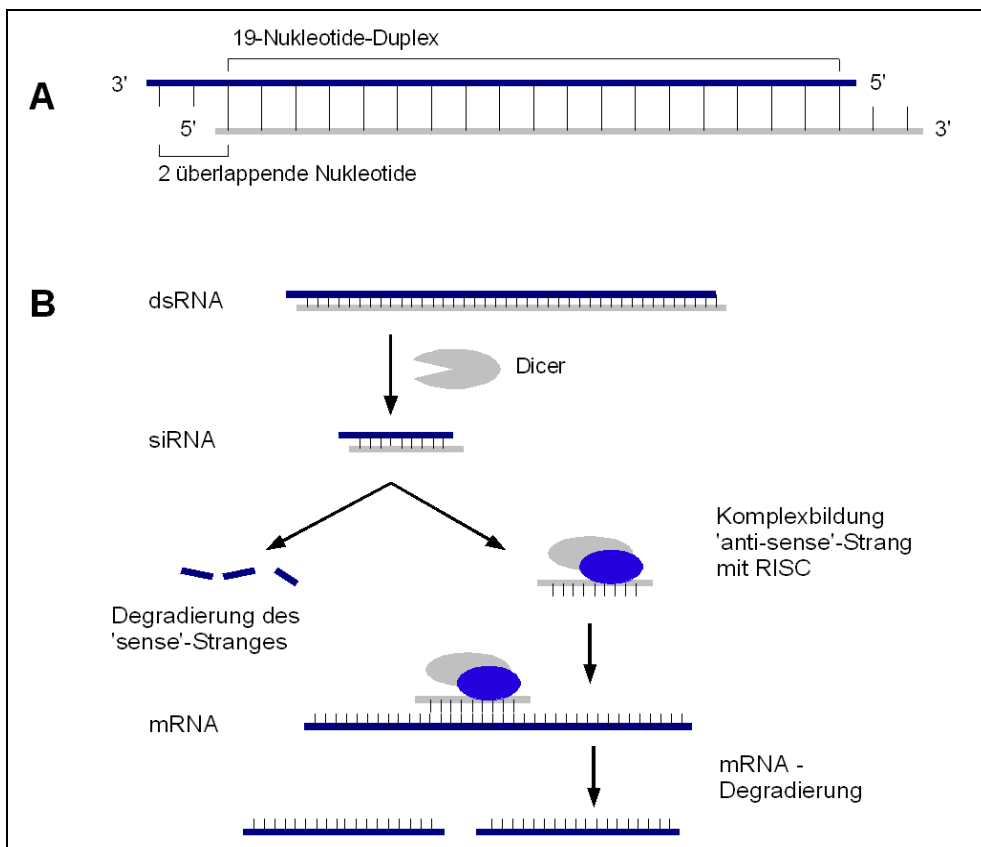


Abbildung 4: Aufbau von siRNA (A) und Mechanismus der RNA-Interferenz (B)

aus: <http://de.wikipedia.org/wiki/RNA-Interferenz> (September 2008)

Der Transfer synthetischer siRNAs in unterschiedliche tierische Zellen führte zu einer effektiven und lang andauernden, aber transienten Inhibition der Zielgenexpression. Die Inhibition von RNA-Interferenz-Konstrukten war in den Studien, die diesen Vergleich durchführten, häufig wesentlich stärker als die Geninhibition durch einzelsträngige Antisense-Oligonukleotide. Durch RNA-Interferenz wird offenbar vorzugsweise zytoplasmatische RNA degradiert. [32] Als Target-Gene können bei der siRNA-Technologie, ähnlich wie bei der AS-ODN-Technologie, prinzipiell alle Gene dienen, die bei Tumoren einer alterierten Expression unterworfen sind. Insbesondere sind hier Gene zu nennen, die funktionell involviert sind in Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose sowie Angiogenese, Invasion und Metastasierung. [32]

1.6.3 Potentielle klinische Anwendung von AS-ODN und siRNAs

Die Erforschung klinisch relevanter Proteine innerhalb der Genese und Progression von Harnblasenkarzinomzellen führte zur Untersuchung von AS-ODN und siRNAs in verschiedenen Modellsystemen mit dem Ziel, die Produktion dieser Proteine effektiv zu inhibieren und somit das Karzinomwachstum zu hemmen.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es im Jahre 2006, die weltweit die erste klinische Studie zur intravesikalen Therapie des Harnblasenkarzinoms mit AS-ODN zu publizieren. [33] Weitere klinische Studien zur Therapie des Harnblasenkarzinoms mit AS-ODN oder siRNA sind derzeit nicht beschrieben. Der Großteil der bisherigen Arbeiten beschränkt sich auf Zellkultur- sowie auf Tierexperimente, wobei die Tumoren subkutan oder orthotop implantiert wurden.

Target	Behandlung	Effekt	Referenz
Clusterin	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Radio- und Chemosensitivierung, Tumorzellen ↓, Lymphknotenmetastasen ↓	Miyake et al., 2001 Miyake et al., 2004 Yamanaka et al., 2005
BCL2	AS-ODN <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Duggan et al., 2001 Hong et al., 2002 Schaaf et al., 2004 Bolenz et al., 2007
Ki-67	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Tumorzellen ↓	Kausch et al., 2003
XIAP	AS-ODN <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Bilim et al., 2003
VEGF	AS-ODN <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Forster et al., 2004 Krause et al., 2005
Survivin	AS-ODN und siRNAs <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Fuessel et al., 2005
hTR	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Tumorzellen ↓	Koga et al., 2001
hTERT	shRNA-Vektor <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Zellzyklusarrest, Tumorzellen ↓	Zou et al., 2005
PLK1	siRNAs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Proliferation ↓, Tumorzellen ↓	Nogawa et al., 2005

Tabelle 2: Wesentliche Studien zur Inhibition verschiedener Antitumortargets mit AS-ODN und siRNAs in Harnblasenkarzinom-Modellen.

2 AUFGABENSTELLUNG

Die beim fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom angewandte systemische Chemotherapie weist ungenügende langfristige Effekte auf und geht zudem mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen einher. [2] Eine Literaturrecherche ergab, dass eine Optimierung der antitumoralen Therapie durch den Einsatz von AS-ODN und siRNAs gegen verschiedene Proteine, die sowohl beim Harnblasenkarzinom als auch bei anderen Karzinomentitäten überexprimiert werden und die dem Tumor Überlebensvorteile bieten, potentiell möglich ist. Durch Hemmung eines tumorspezifischen Targetgens könnten eine effizientere Behandlung ermöglicht und der Einfluss der Behandlung auf gesunde Zellen minimiert werden.

In der vorliegenden Dissertation soll dieser neuartige Therapieansatz im murinen Harnblasentumormodell überprüft werden. Dabei wären zwei Tumormodelle denkbar. Zum einen ein orthotopes Modell, zum anderen ein subkutanes Modell. Zunächst wird versucht, ein orthotopes murines Harnblasentumormodell mit zwei verschiedenen humanen Karzinomzelllinien zu etablieren. Zusätzlich wird versucht, ein subkutanes murines Tumormodell mit denselben Zelllinien zu etablieren.

Das Modell mit der höheren Tumoranwachsrates und mit der geringeren Beeinträchtigung der Versuchstiere soll dann für die folgenden therapeutischen Maßnahmen eingesetzt werden.

Die therapeutischen Studien beginnen mit einem Versuch zur Dosisfindung in der Behandlung mit intraperitoneal appliziertem Cisplatin.

In einer zweiten Therapiestudie wird der Effekt von intraperitoneal applizierten AS-ODN und siRNAs gegen die Targets hTERT, Survivin und VEGF als Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin, bezogen auf Körpergewicht, Tumolvolumen und Überleben der Tiere, untersucht.

Weiterführende zellbiologische und molekulare Untersuchungen sollen in dem Gesamtprojekt durchgeführt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden weibliche SCID-Mäuse verwendet. Diese Tiere zeichnen sich durch einen schweren kombinierten B- und T-Zelldefekt aus. Sie sind homozygot für das SCID-Gen (C. B-17/lcr scid/scid) und coisogen mit dem normalen C. B-17/lcr +/+ Stamm. Die Zucht dieses Stammes erfolgt im Isolator. Bezogen wurden die Tiere von der Firma Charles River, Deutschland. Ihr Alter betrug zum Zeitpunkt der Lieferung 4 – 6 Wochen bei einem Gewicht von 16 – 20 g.



Abbildung 5: Foto einer SCID-Maus

Die weiblichen Tiere zeichnen sich im Vergleich zu den männlichen durch ein geringeres Aggressionspotential aus, was die Haltung in Gruppen erleichtert. Darüber hinaus lassen sich weibliche Tiere besser katheterisieren.

Die Tiere wurden ab dem Zeitpunkt der Lieferung gruppenweise in Standardkäfigen (Kunststoffwanne mit Drahtdeckel) gehalten. Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen erfolgte zunächst eine 14tägige Akklimatisierungsphase. Zur Minimierung des Aggressionsverhaltens wurde die Anzahl der Mäuse pro Käfig auf fünf Tiere beschränkt.

Die Fütterung erfolgte in Form von Pellets, hergestellt von der Firma Altromin GmbH, Lage, bestehend aus folgenden Inhaltsstoffen: Rohprotein 22,5%, Lysin 1,2%, Rohfett 5,0%, Rohfaser 4,5%, Rohasche 6,5%, Calcium 0,9% und Phosphat 0,7%. Zudem enthält das Futter 15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D₃, 75 mg Vitamin E und 5 mg Kupfer je Kilogramm Futtermittel. Wasser wurde über Tränkflaschen bereitgestellt. Die Tiere erhielten Futter und Wasser in sterilisierter Form. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ad libitum und wurde durch Tierpfleger täglich sichergestellt. Die Einstreu der Tiere (Weichholzgranulat, staubfrei, autoklavierbar) wurde zweimal wöchentlich, die Tränkflaschen einmal wöchentlich erneuert.

Aufgrund der hochgradigen Immundefizienz wurden die Mäuse in einem sterilen Bereich der Kleintierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck untergebracht. Die Umweltbedingungen waren bei einer Temperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% konstant.

Gemäß dem Tierschutzgesetz wurden alle experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vom Ministerium für Umweltschutz und Natur des Landes Schleswig-Holstein unter folgenden Aktenzeichen genehmigt: V 362-72241.122-8; (40-4/05), (40-5/05), (55-7/05), (56-7/05).

3.1.2 Tumorzellen

Die humanen BCa-Zelllinien EJ28 und T24 sind unter Standardbedingungen ohne Einsatz von antibiotischen Substanzen kultiviert worden (37°C, 5% CO₂ in der Umgebungsluft). Die Kultur bestand aus DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) mit 4,5 g/l Glukose, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% MEM („Minimum Essential Media“) sowie 1% HEPES („N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid“, C₈H₁₈N₂O₄S). Bei den Bestandteilen dieses Kulturmediums handelt es sich um Produkte der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Nach 72stündiger Bebrütung wurden die Zellen in serumfreies OptiMEM-Medium (ebenfalls Invitrogen) überführt und waren dann bereit für die Instillation in die Harnblasen der Versuchstiere bzw. für die subkutane Implantation.

3.1.3 Blasen Katheter

Die Katheterisierung der Harnblasen der Versuchstiere erfolgte mit peripheren Venenverweilkanülen (Insyte-WTM, Becton-Dickinson, Heidelberg). Die Kanüle besteht aus dem Kunststoff Vialon™, hat einen Außendurchmesser von 0,7 mm (24 G) und eine Länge von 19 mm. Der Totraum dieser Kanüle beträgt 0,05 ml und musste bei der Instillation unbedingt berücksichtigt werden. Nachfolgend beziehen sich die Angaben über instillierte Volumina auf das effektiv intravesikal verabreichte Volumen. Vor der Katheterisierung wurde die Punktionsnadel entfernt und verworfen, so dass lediglich die Kunststoffkanüle transurethral in die Harnblase eingeführt wurde. Nach der Instillation der Tumorzellen wurde der Katheter mit einem Kunststoffkonus (Braun, Melsungen) verschlossen.

3.1.4 Koagulationsgerät und Koagulationselektroden

Die Elektrokoagulation der Blase wurde mit einem Hochfrequenzdiathermiegerät (Elektrotom® 505, Berchtold) durchgeführt. Die Neutralelektrode stammte von der Firma 3M Health Care (Borken, Deutschland). Als Koagulationselektrode wurde die Punktionsnadel eines peripheren Venenverweilkatheters (s.o.) verwendet, wobei die Spitze der Nadel vor Einbringung in die Harnblase abgeschnitten und abgerundet worden ist. Die Elektrode konnte über die bereits in der Harnblase liegende Verweilkanüle eingeführt werden.

3.1.5 Sonstige Materialien

Zur Applikation des Injektionsnarkotikums, der Tumorzellsuspensionen, der intraperitonealen Therapeutika, sowie zur intravesikalen Instillation von Tumorzellsuspensionen wurden 1ml-Einmalspritzen (Braun-Einmalspritze Injekt 40) verwendet.

Zur intraperitonealen Barbituratapplikation und zur subkutanen Injektion der Tumorzellsuspensionen wurden Injektionsnadeln vom Typ BD Microlance™ 3 (26 G ½“, 0,45x13 mm) eingesetzt.

Die Ohrlochung zur Kennzeichnung der Mäuse erfolgte mit einer LUX®-Revolverlochzange.

Für die Rasur der Versuchstiere wurde ein Bartschneider Typ „Phillips Zoom Trimmer HS“ verwendet. Um einen optimalen Kontakt zwischen dem rasierten Hautareal auf dem Rücken der Mäuse und der Neutralelektrode des Diathermiegerätes herzustellen, wurde EKG-Elektrodengel (Tüshaus GmbH, Velen-Ramsdorf) eingesetzt.

Das Körpergewicht der Mäuse und das Gewicht der entnommenen Harnblasen wurden mit einer Sartorius MP8-2 Laborwaage (Sternkopf, Lübeck) bestimmt.

Zur fotografischen Dokumentation kam eine Digitalkamera der Firma Olympus mit integriertem Blitzgerät zum Einsatz.

Entnommene Tumoren und Organe wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen (Eppendorf GmbH, Hamburg) in 4-prozentiger, gepufferter Formalinlösung (Merck, Darmstadt) bis zu ihrer histologischen Aufbereitung asserviert.

3.1.6 Anästhetika

Zur Herstellung des Injektionsnarkotikums wurde eine 1,8 ml wässrige Lösung mit 96 mg Pentobarbital-Natrium angesetzt. Als Hilfsstoff wurde der Lösung Benzylalkohol beigelegt. Die Injektionslösung wurde in der Krankenhausapotheke der Universität hergestellt und steril abgefüllt.

Für die Katheterisierung der Versuchstiere wurde das anästhesierende Gleitmittel Instillagel® (Farco-Pharma GmbH, 50829 Köln) verwendet. Das sterile Gel wirkt durch die Inhaltsstoffe Chlorhexidingluconat und Lidocainhydrochlorid sowohl desinfizierend als auch schmerzstillend.

3.1.7 Intraperitoneal applizierte Therapeutika

PBS (Puffer) wurde durch Lösen von 9 g NaCl, 0,27g KH₂P0₄ und 1,43g Na₂HPO x 2H₂0 in 1000 ml aqua ad injectabilia hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Für die Cisplatintherapie wurde PLATINEX®-Lösung (Bristol-Myers Squibb GmbH, München, Deutschland) verwendet. Eine Durchstechflasche mit 20 ml Infusionslösung enthält 10 mg Cisplatin, Wasser für Injektionszwecke, Natriumchlorid und Salzsäure.

Als AS-ODN wurden AS-SVV286 (gegen das Target Survivin), ASt2331 (gegen das Target hTERT) und NS-K1 (Kontrolle) eingesetzt. Es handelte sich hierbei um Produkte der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Jedes Therapeutikum wurde in jeweils einem Eppendorf-Reaktionsgefäß geliefert und war zum Zeitpunkt der Lieferung bereits gelöst und aliquotiert.

Alle siRNAs waren Produkte der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Eingesetzt wurden si-SVV284 (gegen das Target Survivin), si-hTERT2 (gegen das Target hTERT), si-VEGF865 (gegen das Target VEGF) und NS-si (non-silencing siRNA). Die einzelnen siRNAs wurden in jeweils einem Eppendorf-Reaktionsgefäß geliefert und waren zum Zeitpunkt der Lieferung bereits gelöst und aliquotiert.

Die folgenden Tabellen zeigen die Sequenzen der verwendeten ODNs und der siRNAs:

Target	ODN	Sequenz (5'→3')
Survivin	AS-SVV286	AAGCGCAACCGGACGAATGC
hTERT	ASt2331	GGTAGAGACGTGGCTCTTGA
--	NS-K1	TAAGCTGTTCTATGTGT

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten AS-ODN

Target	siRNA	Sense-Strang (5'→3')	Antisense-Strang (3'→5')
Survivin	si-SVV284	GCAUUCGUCCGGUUGCGCudTdT	AGCGCAACCGGACGAAUGCdTdT
hTERT	si-hTERT2	GCUCCCAUUUCAUCAGCAAdTdT	UGCUGAUGAAAUGGGAGCdTdG
VEGF	si-VEGF865	CACGGUCCCUCUUGGAAUudTdT	AUUCCAAGAGGGACCGUGdCdT
--	NS-si	UUCUUCGAACGUGUCACGUdTdT	ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten siRNAs

3.2 Methoden

3.2.1 Anästhesie

Die Narkotisierung der Versuchstiere erfolgte intraperitoneal in einer gewichtsorientierten Dosierung von 40 mg Pentobarbital/Kilogramm Körpergewicht. Nach der Gewichtskontrolle wurden die Tiere an einer Hautfalte im Nacken gefasst. Die intraperitoneale Injektion des Narkotikums erfolgte dann im medialen Bereich des unteren Abdomens. Um Verletzungen von Leber, Darmschlingen und wichtigen Gefäßen zu vermeiden, wurden die Tiere in Kopftieflagerung narkotisiert. Die Narkosedauer betrug durchschnittlich eine Stunde. In Einzelfällen konnte mit der Initialdosis nicht die gewünschte Narkosedauer und -wirkung erzielt werden, so dass ein Drittel der Initialdosis intraperitoneal nachinjiziert werden musste.

3.2.2 Kennzeichnung der Tiere

Die narkotisierten Mäuse wurden jeweils zu Beginn der Experimente durch Ohrlochung mit einer Revolverzange gekennzeichnet, um eine individuelle Verlaufsbeobachtung zu ermöglichen. Dabei wurden nach dem folgenden Schema Löcher in die Ohren der Mäuse gestantzt:

Maus 1: kein Ohrloch

Maus 2: ein Loch im linken Ohr

Maus 3: ein Loch im rechten Ohr

Maus 4: ein Loch im rechten Ohr, ein Loch im linken Ohr

Maus 5: zwei Löcher im linken Ohr.

3.2.3 Rasur

Um eine geeignete Kontaktstelle für die Neutralelektrode des Koagulationsgerätes zu schaffen, bzw. um die Tumorzellsuspensionen subkutan injizieren zu können, musste zunächst ein etwa 1 cm² großes Areal auf dem Rücken der Versuchstiere rasiert werden. Die Mäuse wurden vor der Rasur narkotisiert, um sowohl das Verletzungsrisiko als auch den Stress für die Tiere zu minimieren.

3.2.4 Katheterisierung

Die Katheterisierung der narkotisierten Mäuse erfolgte in Rückenlage. Vor Einbringen des Katheters wurde dieser zunächst in ein Gleitmittel eingetaucht. In einem Winkel von ungefähr 60° wurde dann die Katheterspitze in das Orifizium urethrae eingeführt. Nach Absenken des Katheters auf einen Winkel von 20-30° wurde versucht, den Katheter mit leichtem Druck etwa 1,5 cm weit in die Harnblase vorzuschieben. Bei korrekter Einbringung tropfte, je nach Füllung der Blase entweder spontan oder nach Ausübung von leichtem Druck auf das untere Abdomen, Urin über den Katheter ab. Auf diese Weise konnte die Blase für die nachfolgende Instillation entleert werden.

3.2.5 Elektrokoagulation der Harnblase

Nach Narkotisierung, Rasur und Katheterisierung wurde die Maus mit dem rasierten Hautareal auf die mit Elektrodengel versehene Neutralelektrode des Koagulationsgerätes gelegt. Über den in der Harnblase liegenden Katheter konnte die Koagulationselektrode eingeführt werden. Der Koagulationsdraht musste etwa 2 mm aus dem Katheter herausragen, d.h. das Ende des Drahtes musste frei in der Blase liegen, ohne vom Katheter umhüllt zu sein. Sobald ein leichter Widerstand spürbar wurde, hatte die Elektrode die Blasenwand erreicht. Dann

wurde mit dem Diathermiegerät eine monopolare Koagulation durchgeführt. Die Blase wurde mit der geringst möglichen Intensität (5 W) für ungefähr eine Sekunde koaguliert. Die so herbeigeführte Verletzung begünstigte das Tumorwachstum in der Harnblase. [34]

3.2.6 Tumorzellinstillation in die Blase

Nach dem Entfernen der Koagulationselektrode wurde leichter Druck auf das Abdomen der Mäuse ausgeübt, um die Harnblase möglichst vollständig zu entleeren. Mit Zellstoff wurde der Urin aus dem Ansatzkonus des Katheters entfernt, schließlich sollte der Urin bei der Instillation der Tumorzellsuspension nicht wieder in die Blase gelangen. Dann wurden 100 Mikroliter der Tumorzellsuspension instilliert, wovon aufgrund des Totraumes des Katheters nur 50 Mikroliter die Blase der Versuchstiere erreichten.

Um eine reflektorische Blasenentleerung zu vermeiden, wurde die Blase wie bereits beschrieben vor der Instillation entleert. Zusätzlich musste die Instillation sehr langsam durchgeführt werden.

Nach der Instillation wurde der Katheter mit einem Kunststoffkonus verschlossen und bis zum Erwachen der Mäuse in situ belassen. So konnte ein ausreichend langer Kontakt von Blasenepithel und Tumorzellen gewährleistet werden. Die Mäuse verloren den Katheter mit den ersten Bewegungen, nachdem sie sich ungefähr eine Stunde in Narkose befunden hatten.

3.2.7 Subkutane Tumorzellimplantation

Mittels einer 1 ml-Einmalspritze wurden jeweils 100 Mikroliter der unterschiedlichen Tumorzellsuspensionen subkutan oberhalb der linken Flanke injiziert. Vor dem Herausziehen der Nadel wurde einige Sekunden gewartet, damit die Flüssigkeit nicht sofort wieder aus der Einstichstelle austrat und verloren ging.

3.2.8 Applikation der Therapeutika

Alle Therapeutika sowie das Narkotikum wurden im medialen Bereich des unteren Abdomens intraperitoneal injiziert. Um Verletzungen von Leber, Darmschlingen

und wichtigen Gefäßen zu vermeiden, erfolgte die Injektion in Kopftieflagerung der Versuchstiere.

3.2.9 Opferung der Mäuse

Tiere, die einen festgelegten Zeitraum überlebt hatten, bzw. deren Tumoren ein Volumen von 500 mm^3 erreicht hatten, wurden mithilfe von Kohlendioxid in einem dafür vorgesehenen, abgeschlossenen Käfig für einige Minuten begast. Anschließend wurden die Tiere auf das Vorhandensein von sicheren Todeszeichen untersucht.

3.2.10 Archivierung der Befunde

Während der experimentellen Phase dieser Dissertation wurde ein Labortagebuch angelegt, in dem die Befunde der zweitägigen Visiten vermerkt wurden. Befundet wurde das Gewicht der Tiere, die Größe der subkutanen Tumoren, bzw. der Tastbefund des Unterbauches und der Urinbefund. Verhaltens- und Fell auffälligkeiten wurden zusätzlich dokumentiert.

3.2.11 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen dieser Dissertation gliedern sich in 4 Hauptversuchsteile:

3.2.11.1 **Versuch 1:**

Etablierung eines orthotopen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells

Ziel dieses Versuches war es, das orthotope, murine Tumormodell MB49 zu modifizieren und ein Tiermodell mit zwei humanen Harnblasentumorzelllinien zu etablieren. Im Rahmen einer Literaturrecherche konnte kein geeignetes orthotopes Blasentumormodell mit humanen Blasenkarzinomzelllinien gefunden werden.

Zur präklinischen Evaluierung unterschiedlicher Therapieoptionen *in vivo* wurden bisher Harnblasenkarzinommodelle der Maus oder der Ratte eingesetzt. Die Arbeitsgruppe um Böhle et al. konnte das orthotope syngene murine Blasenkarzinommodell MB49 etablieren und optimieren. [34] Dabei wurden murine Blasenkarzinomzellen nach vorheriger Setzung einer Koagulationsnekrose in die Harnblasen der Versuchstiere instilliert. In mehreren Publikationen konnte die Arbeitsgruppe das murine Blasentumormodell MB 49 bei experimentellen Therapieversuchen des Blasenkarzinoms einsetzen [34,35,36].

In weiteren Ansätzen anderer Arbeitsgruppen wurden immundefizienten Tieren Blasenkarzinomzellen subkutan, intraperitoneal oder intravenös implantiert; kein Modell konnte jedoch sicher das Anwachsen eines Tumors oder eine Metastasierung analog dem Tumorgeschehen beim Menschen widerspiegeln.

Die Arbeitsgruppe um Oshinsky et al. konnte mit humanen Blasenkarzinomzellen ein Modell etablieren, bei dem nach orthotoper Implantation eine 100%ige Tumortakerate mit systemischer Metastasierung der Tumorzellen in die Lungen der Nacktmäuse erzielt wurde [37,38]. Die orthotope Implantation der humanen Blasenkarzinomzellen erfolgte jedoch in einer für die Tiere sehr belastenden Operation mit Laparotomie, Mobilisation und Eröffnung der Blase. Operative Eingriffe sind jedoch mit hohen Infektionsraten verbunden. Überdies neigen derartig implantierte Tumoren aufgrund des externen Zugangs zu einem Tumorwachstum außerhalb der Blase.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte ein zuverlässiges Tumormodell entwickelt werden, welches das Tumorgeschehen beim Menschen widerspiegelt und welches die Belastung der Versuchstiere auf ein Minimum reduziert.

Es wurden daraufhin 4 Gruppen zu je 6 Mäusen gebildet. Die Bewilligung von Tierversuchen mit SCID-Mäusen wird durch die Tierschutzkommission sehr restriktiv gehandhabt. Bezüglich der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe musste folglich ein Kompromiss eingegangen werden. Mit 6 Tieren pro Gruppe erschienen statistisch ausreichende Informationen gewonnen werden zu können.

Für jede der beiden Zelllinien wurden zwei Zellzahlmengen evaluiert. Diese richteten sich nach Erfahrungen in Vorversuchen. Die folgende Tabelle zeigt die Aufteilung der Gruppen mit der zugehörigen Zelllinie und Zellzahlmenge:

Gruppe	Zelllinie und Zellzahl	Anzahl der Versuchstiere
1	EJ28 1×10^7 Zellen	6
2	EJ28 5×10^6 Zellen	6
3	T24 1×10^7 Zellen	6
4	T24 5×10^6 Zellen	6

Die Versuchstiere der Gruppe 1 erhielten intravesikal 1×10^7 Zellen der Linie EJ28. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten die gleiche Tumorzelllinie, jedoch in niedrigerer Zellzahl von 5×10^6 /100 μ l Medium. Die genaue Tumorzellinstillation wird unter 3.2.6 beschrieben. Den Tieren der Gruppe 3 wurde die humane Zelllinie T24 intravesikal in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/100 μ l Medium instilliert. Die Versuchstiere der Gruppe 4 erhielten schließlich 5×10^6 Zellen/100 μ l Medium der Zelllinie T24.

Im Verlauf wurden die vier Gruppen dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags) untersucht. Dabei wurden folgende Auffälligkeiten dokumentiert:

1. Körpergewicht der Tiere,
2. das Auftreten von Makrohämaturie als Zeichen für ein Tumorwachstum,
3. Fellauffälligkeiten,
4. palpable Tumoren,
5. Verhaltensauffälligkeiten.

Die Untersuchung erfolgte hierbei durch tiefe Palpation im Unterbauch der Tiere. Tumoren der Blase ließen sich oberhalb der Symphyse tasten. Zusätzlich konnte

durch die Palpation die Miktion ausgelöst werden und so eine eventuell vorhandene Makrohämaturie festgestellt werden.

Tiere, die vorzeitig verstorben waren, mussten sofort aus den Käfigen entfernt werden, da die Kadaver sonst von den Artgenossen aufgefressen worden wären. Sie wurden dann bis zur Sektionierung bei -20°C in der Tiefkühleinrichtung des Tierlabors aufbewahrt.

Sobald mindestens zwei Tiere einer Gruppe einen palpablen Tumor entwickelt hatten, bzw. sobald zwei Tiere mit nachweisbarem Tumor verstorben waren, sollte es zur Opferung der gesamten dazugehörigen Gruppe kommen, unter der Annahme, dass unter gleichen experimentellen Bedingungen auch bei den restlichen Tieren dieser Gruppe bereits ein Tumor vorliegen müsste, der jedoch der Palpation entgeht.

Am 80. Tag nach der Tumorzellinstillation wurden die überlebenden Tiere der Gruppen 1 und 2 geopfert, da hier die vor Versuchsbeginn festgelegten Kriterien erfüllt waren. Am Tag 115 erfolgte die Opferung der Mäuse der Gruppen 3 und 4. In diesen Gruppen fand sich zu diesem Zeitpunkt insgesamt nur ein sicher tumortragendes Tier, so dass die Kriterien zur Beendigung der Studie nicht erfüllt waren. Es wurde dann aber die Annahme getroffen, dass Tumoren, die zu diesem Zeitpunkt nicht angewachsen waren auch nicht mehr anwachsen würden.

Im Anschluss an die Tötung mittels CO₂-Gas erfolgte die Sektionierung der Versuchstiere. Zur Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle wurde zunächst ein Längsschnitt von der Symphyse bis zum Sternum durchgeführt. Anschließend wurde das Peritoneum dargestellt, auf Metastasen untersucht und eröffnet. Dann wurde die Blase aufgesucht und vom perivesikalen Fettgewebe befreit. Die Blase wurde am Übergang zur Urethra abgesetzt, eröffnet und makroskopisch auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht. Anschließend wurde das Blasengewicht bestimmt. Zusätzlich wurden Nieren, Harnleiter, Leber und Lunge der Mäuse auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht. Auffällige Sektionsbefunde wurden fotografisch dokumentiert, in Formalin fixiert und asserviert.



Abbildung 6: Sektionsfoto. Deutlich zu erkennen ist der große Tumor der Harnblase.

3.2.11.2 Versuch 2:

Etablierung eines subkutanen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells

Vor dem Hintergrund der unbefriedigenden Tumoranwachsraten im orthotopen Tumormodell, sollte ein subkutanes, humanisiertes Harnblasentumor-Mausmodell etabliert werden, welches eine präklinische Testung unterschiedlicher Therapeutika *in vivo* ermöglicht. Hierzu wurden, wie in der folgenden Tabelle veranschaulicht, 37 Mäuse auf 5 Gruppen verteilt:

Gruppe	Zelllinie und Zellzahl	Anzahl der Versuchstiere
1	EJ28 1×10^6 Zellen	12
2	EJ28 1×10^7 Zellen	9
3	T24 1×10^6 Zellen	4
4	T24 5×10^7 Zellen	6
5	T24 1×10^8 Zellen	6

Die Anzahl der Versuchstiere unterlag auch bei diesem Versuch der Bewilligung durch die Tierschutzkommission. Die Gruppen waren so groß, dass statistisch ausreichende Informationen gewonnen werden konnten.

Für jede der beiden Zelllinien wurden Zellzahlmengen evaluiert, die sich nach Erfahrungen in Vorversuchen richteten.

Den 12 Versuchstieren der Gruppe 1 wurde die humane Tumorzelllinie EJ28 in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/100 μ l Medium subkutan im Bereich der linken Flanke injiziert (siehe 3.2.7). Den 9 Tieren der Gruppe 2 wurde dieselbe Tumorzelllinie in höherer Konzentration von 1×10^7 Zellen/100 μ l Medium subkutan injiziert.

Gleichzeitig sollte das Wachstum einer zweiten Tumorzelllinie im Mausmodell untersucht werden. Dazu wurde die humane Zelllinie T24 eingesetzt.

Den 4 Versuchstieren der Gruppe 3 wurden T24-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/100 μ l Medium subkutan injiziert. Schließlich wurden zwei weitere Gruppen zu je 6 Mäusen gebildet. Die Tiere der Gruppe 4 erhielten T24-Zellen in einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/100 μ l Medium, die Tiere der Gruppe 5 erhielt 1×10^8 Zellen/100 μ l Medium.

Ziel dieses Versuches war es nun, sowohl eine Tumorzelllinie als auch eine geeignete Zellzahl zu ermitteln, um ein zuverlässiges Harnblasentumor-Mausmodell für folgende Interventionsstudien zu etablieren.

In Anbetracht der geplanten Studien muss ein ideales Tumormodell mehrere Bedingungen erfüllen. So sollte es innerhalb weniger Tage nach Applikation der Zellen zu einem zuverlässigen, stetigen Wachstum der Tumoren kommen, der Tumorverlauf sollte keine rückläufige Tendenz zeigen, und die Tiere müssen mindestens 45 Tage überleben, da für Versuch 3 der Tag 35 als letzter Therapietag festgelegt worden ist und danach noch mindestens 5 weitere Messungen zur Datenerhebung folgen sollten.

Die Tiere wurden dann dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags) visitiert und auf Veränderungen des Körpergewichts, Fellauffälligkeiten und palpable Tumoren untersucht. Die Tumoren wurden mithilfe einer Schiebelehre vermessen. Sobald das Tumolvolumen eine Größe von 500 mm^3 erreicht hatte,

wurden die Tiere geopfert, um sie nicht unnötig leiden zu lassen. Die restlichen Tiere wurden geopfert, nachdem ihr Tumorwachstum über längere Zeit stagniert war.



Abbildung 7: Foto einer Maus mit subkutanem Tumor



Abbildung 8: Tumor aus Abbildung 7 nach subkutaner Präparation

3.2.11.3 **Versuch 3:**

Therapieversuch und Dosisfindung mit intraperitoneal appliziertem Cisplatin im subkutanen Blasentumor-Mausmodell

Zunächst wurden 17 Mäusen Tumorzellen der Linie EJ28 in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/100 μ l Medium subkutan, wie in 3.2.7 beschrieben, implantiert. Diese Zelllinie und Zellzahlmenge hatte sich im Versuch 2 als ideal für ein subkutanes Blasentumor-Mausmodell erwiesen. Die Gruppengröße sollte angesichts der restriktiven Bewilligung durch die Tierschutzkommission genügen, um statistisch ausreichende Aussagen treffen zu können.

Die Tiere wurden dann dreimal wöchentlich in dem üblichen Rhythmus visitiert. Dabei wurden sie untersucht auf Gewichtsveränderungen, Fellauffälligkeiten und Tumolvolumina. Sobald die Tumoren ein Volumen von ca. 4 mm³ erreicht hatten, wurde mit der Cisplatin-Therapie begonnen. Dies war am Tag 4 nach Injektion der Tumorzellen der Fall. Es wurden dann, wie in der folgenden Tabelle dargestellt, drei Gruppen gebildet.

Gruppe	Therapeutikum	Anzahl der Versuchstiere
1	NaCl	5
2	Cisplatin 1,5 mg/kgKG	6
3	Cisplatin 3,3 mg/kg KG	6

Gruppe 1 bestand aus 5 Tieren und bildete die Negativ-Kontrollgruppe. Diese Tiere erhielten keine Therapie mit Cisplatin. Ihnen wurde an den Therapietagen NaCl intraperitoneal injiziert, um ihr Stressniveau auf dem der behandelten Tiere zu halten. Gruppe 2 bestand aus 6 Tieren, denen an den Tagen 4, 5, 6, 19, 20, 21, 33, 34 und 35 jeweils 1,5 mg Cisplatin/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert wurde. Gruppe 3 bestand ebenfalls aus 6 Tieren. Diesen Mäusen wurde an den o.g. Tagen Cisplatin intraperitoneal injiziert, dies jedoch in einer höheren Dosierung von 3,3 mg/kg Körpergewicht pro Behandlungstag. Das Therapieschema stützte sich auf eine Publikation von Citro et al.. Diese

Arbeitsgruppe konnte durch intraperitoneale Applikation von Cisplatin im murinen Tumormodell eine Wachstumshemmung von Melanomen erzielen. [39]

Die Tiere wurde bei diesem Versuch geopfert, sobald ihr Tumolvolumen eine Größe von 500 mm^3 erreicht hatte.

Zwischen Opferung und Tod soll bei der Auswertung der Daten dieses Versuches nicht unterschieden werden, weil ein Tumolvolumen von 500 mm^3 mit einem baldigen Todeseintritt gleichzusetzen ist.

3.2.11.4 **Versuch 4:**

Überprüfung des Effektes von intraperitoneal applizierten AS-ODN und siRNAs gegen die Targets hTERT, Survivin und VEGF als Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin im subkutanen Blasentumor-Mausmodell

In diesem Versuch wurden 111 Mäusen Tumorzellen der Linie EJ28 in einer Dosierung von 5×10^6 Zellen/100 μl Medium subkutan implantiert. Diese Zelllinie und Zellzahlmenge hatte sich im Versuch 2 als ideal für ein subkutanes Blasentumor-Mausmodell erwiesen. Die Tiere wurden dann in 16 Behandlungsarme randomisiert, wobei jeder Arm aus 7 Tieren bestand. Lediglich der Arm 16 bestand aus 6 Tieren. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe sollte genügen, um statistisch ausreichende Informationen gewinnen zu können.

Sobald die Tumoren der Versuchstiere ein Volumen von 4 mm^3 erreicht hatten, was bereits am Tag 1 nach der Tumorzellimplantation der Fall war, wurde mit der intraperitonealen Therapie der Tumoren begonnen. Die Mäuse erhielten AS-ODN und siRNAs gegen die Targets Survivin, hTERT und VEGF, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Cisplatin, nach folgendem Schema:

Gruppen	Therapeutika
1	AS-SVV286 (AS-ODN gegen Survivin)
2	AS2331 (AS-ODN gegen hTERT)
3	NS-K1 (Nonsense-Kontrolle)
4	si-SVV284 (siRNA gegen Survivin)
5	si-hTERT2 (siRNA gegen hTERT)
6	si-VEGF (siRNA gegen VEGF)
7	NS-si (non-silencing siRNA= Negativkontrolle)
8	AS-SVV286 + Cisplatin
9	AS2331 + Cisplatin
10	NS-K1 + Cisplatin
11	si-SVV284 + Cisplatin
12	si-hTERT2 + Cisplatin
13	si-VEGF + Cisplatin
14	NS-si + Cisplatin
15	Puffer
16	Cisplatin

Als Negativkontrollen wurden NS-si (= non-silencing siRNA), NS-ODN (= NS-K1) und Puffer gegeben. Cisplatin wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Applikation der Therapeutika erfolgte an den Tagen 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17 und 19 nach Tumorzellimplantation. Aufgrund der Tumorverlaufskurven sollte die Therapie in einem Zeitraum von maximal 3 Wochen erfolgen. Die Injektion alle 2-3 Tage stellte hier einen für die Tiere verträglichen Rahmen dar.

Die mit Cisplatin therapierten Mäuse erhielten mit jeder Gabe jeweils 1,5 mg Cisplatin/kg Körpergewicht. Die verschiedenen ODN wurden in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die siRNA-Gabe erfolgte

in einer Dosierung von 4,6 mg/kg Körpergewicht pro Tier und pro Gabe. Die Dosierungen richteten sich nach Erfahrungen in Vorversuchen.

Bei den Kombinationstherapien wurde das Cisplatin jeweils eine Stunde nach Applikation des vorhergehenden Therapeutikums intraperitoneal injiziert.

Die Mäuse wurden dann dreimal wöchentlich in dem üblichen Rhythmus visitiert. Dabei wurden sie auf Gewichtsveränderungen, Fellauffälligkeiten, Tumorumfängen und Verhaltensauffälligkeiten untersucht.

Am Tag 17 nach Tumorzellgabe sollte die Aufnahme der Nukleinsäurekonstrukte in das Zielgewebe sowie in unterschiedliche Organgewebe überprüft werden. Dazu wurde ein Tier pro Gruppe geopfert. Bei Gruppen, in denen bis zu diesem Zeitpunkt schon ein Tier verstorben war, wurde keine Opfertierung durchgeführt, sondern das verstorbene Tier untersucht. Bei der Sektion wurden Tumor, Leber und Nieren gewonnen. Eine Hälfte der gewonnenen Gewebe wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und mit 4%iger Formalinlösung bedeckt. Die andere Hälfte der Gewebe wurde in weiteren Eppendorf-Gefäßen asserviert, mit Gefriermedium bedeckt und in flüssigen Stickstoff getaucht.

Sobald die Tumoren der restlichen Tiere ein Volumen von 500 mm³ erreicht hatten, wurden diese geopfert und wie bereits oben beschrieben sezziert.

Die bei diesem Versuch entnommenen Gewebe sind weiter aufgearbeitet und feingeweblich untersucht worden. Dabei sind im Einzelnen folgende Untersuchungen durchgeführt worden:

1. HE-Färbung der Gewebe,
2. Immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügbarkeit FITC-markierter siRNAs und AS-ODN nach systemischer Applikation,
3. Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Methode,
4. Untersuchungen zur Gen-Expression.

Da diese Untersuchungen nicht im Fokus dieser Dissertation stehen, wird bezüglich der Materialien und Methoden auf die bereits publizierte Arbeit [40] verwiesen.

3.2.12 Statistik

Bei der Auswahl geeigneter statistischer Testverfahren konnte die Beratung des Instituts für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität zu Lübeck in Anspruch genommen werden.

Quantitative Größen wie Tumorumfänge und Gewicht wurden beschreibend anhand von Mittelwert und Standardabweichung, bzw. dem Minimum und Maximum dargestellt. Ereigniszeiten, wie die Zeit bis zum Tod oder zur Opferung der Tiere, wurden anhand von mittleren Zeiten bis zum Eintreten des Ereignisses mit 95%-Vertrauensbereich, Minimum und Maximum sowie der medianen Zeit, also dem Zeitraum, nach dem die Hälfte der Ereignisse eingetreten waren, beschrieben.

Die Versuche 1 und 2 wurden rein deskriptiv ausgewertet und dargestellt, während bei den Versuchen 3 und 4 eine analytische Auswertung erfolgte.

Im ersten Versuch wurden Spezifität, Sensitivität, positiver sowie negativer Vorhersagewert der Palpation von Tumoren durch die Bauchdecke als Parameter für Tumorstadium mithilfe der Vierfeldertafel bestimmt.

Im dritten Versuch wurde mittels Varianzanalyse für Messwiederholungen geprüft, ob sich eine Veränderung des Gewichts oder des Tumorumfanges nachweisen ließ, wobei die untersuchten Behandlungsgruppen als Faktor einbezogen wurden. Betrachtet wurde die Veränderung zwischen den Tagen 1, 8, 21 und 35. Post-Hoc-Paarvergleiche zwischen den Messwiederholungen wurden mittels Berechnung linearer Kontraste durchgeführt, bei signifikantem Gruppeneffekt erfolgten die Paarvergleiche nach Scheffé oder Games-Howell.

Im vierten Versuch wurden die Therapiegruppen AS-ODN, siRNA, AS-ODN plus Cisplatin sowie siRNA plus Cisplatin getrennt betrachtet. Zum einen wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, wobei die Therapiegruppen zusätzlich mittels Log-Rang-Test untereinander und mit der jeweiligen Kontrollgruppe hinsichtlich des Überlebens verglichen wurden. Weiterhin wurde mittels gemischt linearem

Modell untersucht, inwieweit eine signifikante Veränderung des Tumorzvolumens zu beobachten war, und ob sich dabei ein Unterschied zwischen den jeweils betrachteten Behandlungs- und Kontrollgruppen nachweisen ließ.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Eine alpha-Adjustierung aufgrund multiplen Testens wurde nicht durchgeführt, da die vorliegenden Versuche einen rein explorativen Charakter hatten und keine Hypothesen im Vorfeld formuliert wurden. Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen wurden entsprechend unter Vorbehalt interpretiert und diskutiert.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei allen Grafiken auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

Die statistische Analyse und Grafikerstellung erfolgte mit SPSS für Windows, Version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL) und Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuch 1

(Etablierung eines orthotopen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells)

4.1.1 Tumoranwachsrates

Der Tumornachweis erfolgte durch makroskopische Begutachtung der Harnblasen bei der Sektion und mithilfe der mikroskopischen Begutachtung der bei der Sektion entnommenen Gewebe. Zusätzlich ist das Blasengewicht aller Tiere ermittelt worden.

In der Gruppe 1 (Zelllinie EJ28, 1×10^7 Zellen) entwickelten 2 der 6 Tiere einen Harnblasentumor. Die Tumoranwachsrates beträgt demnach für diese Gruppe 33%.

In der Gruppe 2 (Zelllinie EJ28, 5×10^6 Zellen) kam es zu einem vorzeitigen Versterben der Hälfte der Versuchstiere (3/6). Ursächlich dafür war vermutlich die Koagulation mit einer für die Blase der Tiere zu hohen Intensität. Obwohl die Koagulation mit der geringstmöglichen Intensität (5 W) durchgeführt worden war, zeigte sich bei der Sektion dieser Tiere eine Perforation der Harnblase. Von den restlichen 3 Tieren entwickelten 2 einen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch verifizierten Tumor in der Harnblase. Für die Gruppe 2 beträgt die Tumoranwachsrates demnach 33%.

Die Tumorzellen der Linie T24, die in den Gruppen 3 und 4 instilliert worden waren, wiesen in beiden applizierten Konzentrationen eine geringere Tumoranwachsrates auf. In den Gruppen 3 und 4 entwickelte jeweils nur ein Tier einen Tumor, so dass unabhängig von der Konzentration der Tumorzellen ein Tumortake von 17% erreicht werden konnte.

Tumorstadium	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
positiv	2	2	1	1
negativ	4	4	5	5
Tumoranwachstumsrate	33%	33%	17%	17%

Tabelle 5: Tumoranwachstumsrate in den unterschiedlichen Gruppen

Bei keinem der sektionierten Tiere fanden sich Hinweise für eine Metastasierung.

In der weiteren Darstellung der Ergebnisse werden die tumortragenden Tiere aus Gruppe 1 als Maus 1 und 2, die aus Gruppe 2 als Maus 3 und Maus 4 bezeichnet. Das tumortragende Tier aus Gruppe 3 wird als Maus 5 bezeichnet, das aus Gruppe 4 als Maus 6.

4.1.2 Makrohämaturie

Keines der untersuchten Tiere wies im Beobachtungszeitraum eine Makrohämaturie auf. Die Makrohämaturie kann also nicht als Diagnoseparameter für das Vorliegen eines Tumors gewertet werden.

4.1.3 Palpation der Tumoren

Ein Zeichen für das Vorliegen eines Tumors ist die Palpierbarkeit einer Resistenz oberhalb der Symphyse der Versuchstiere. Basierend auf der Untersuchungsmethode der tiefen Palpation konnte bei 50% der tumortragenden Tiere die Verdachtsdiagnose „Vorliegen eines Harnblasentumors“ gestellt werden. Diese Diagnose ließ sich in 100% der Fälle histologisch bestätigen. In 50% der Fälle ließ sich trotz Vorliegen eines Tumors keine Resistenz tasten.

Die folgende Tabelle zeigt die Vierfeldertafel zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität, negativem und positivem Vorhersagewert für die Variable „palpabler Blasentumor“.

Gesamt (24)	Blasentumor palpabel	Blasentumor nicht palpabel
Tumorwachstum (6)	3 (a)	3 (b)
kein Tumorwachstum (18)	0 (c)	18 (d)

Tabelle 6: Vierfeldertafel für die Variable „palpabler Blasentumor“

Die Vierfeldertafel liefert folgende Ergebnisse:

Sensitivität ($a/a+b$) = 50%

Spezifität ($d/c+d$) = 100%

Positiver Vorhersagewert ($a/a+c$) = 100%

Negativer Vorhersagewert ($d/b+d$) = 86%

Ein wichtiger Parameter für die Ertastbarkeit eines Blasentumors scheint neben der Tumorkonsistenz im Besonderen die Tumorgöße zu sein. Bei der Sektion der Tiere sind die Harnblasen entnommen und zusammen mit dem sich darin befindlichen Tumor gewogen worden. Tabelle 7 zeigt das Gewicht von Harnblase plus Tumor bei den 6 tumortragenden Tieren:

	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6
Tumorzelllinie und -zahl	EJ28 1×10^7	EJ28 1×10^7	EJ28 5×10^6	EJ28 5×10^6	T24 1×10^7	T24 5×10^6
Gewicht Blase+Tumor	123 mg	350 mg	24 mg	781 mg	483 mg	106 mg
Tumor palpabel	nein	ja	nein	ja	ja	nein
Tumor palpabel ab Tag	--	70	--	35	87	--

Tabelle 7: Auflistung der tumortragenden Tiere unter Berücksichtigung der Tumorzelllinie und -zahl, des Gewichtes entnommener Harnblasen plus Tumor bei der Sektion sowie der Palpabilität der Tumoren

Die Gewichtsmessung der entnommenen Harnblasen zeigte, dass Harnblasen mit palpablen Tumoren mit einem mittleren Gewicht von 538 mg (min.-max.: 24 mg - 781 mg) deutlich schwerer waren als gesunde Harnblasen mit einem Durchschnittsgewicht von 20 mg (min.-max.: 10 mg -27 mg). Kleine Tumoren bei Harnblasengewichten zwischen 24 und 123 mg konnten palpatorisch nicht nachgewiesen werden. Der erste Tumor ließ sich ab Tag 35 nach Tumorzellinstillation tasten.

4.1.4 Gewichtsverhalten

Einen Tag vor Versuchsbeginn betrug das Durchschnittsgewicht aller Versuchstiere 18,63 g (SA 1,29). Am Tag 3 nach Tumorzellinstillation war das Durchschnittsgewicht auf 17,56 g (SA 0,94) gesunken. Dieser Gewichtsverlust könnte durch vermehrten Stress periinterventionell zu begründen sein.

Die nicht-tumortragenden Tiere konnten ihr durchschnittliches Gewicht im Laufe des Beobachtungszeitraumes nahezu kontinuierlich steigern. Dieser Anstieg im Gewichtsverlauf ist als physiologisch zu werten. Die Tiere waren zu Beginn des Versuchs 6 Wochen alt und haben vermutlich mit zunehmendem Alter bei optimalen Ernährungsbedingungen ihr Gewicht steigern können.

An Tag 80 nach Tumorzellinstillation betrug das mittlere Gewicht dieser nicht-tumortragenden Tiere 21,00 g (min.-max.: 19 -23 g). Am Tag 115 lag das durchschnittliche Körpergewicht der bis dato noch lebenden, nicht-tumortragenden Versuchstiere bei 21,38 g (min.-max.: 20-23g).

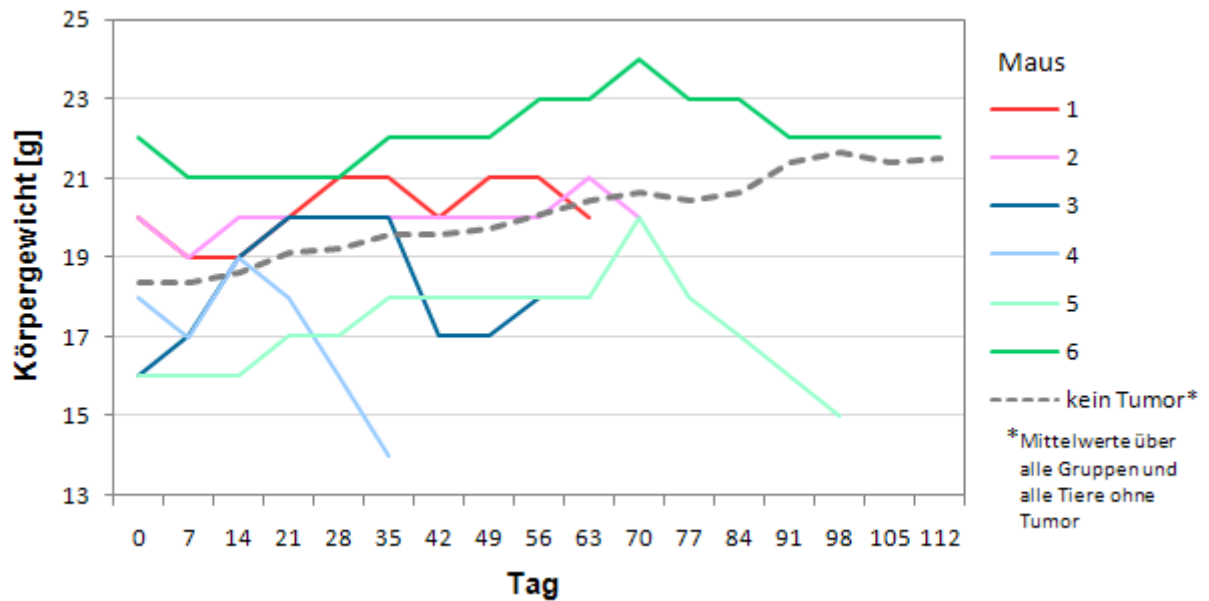


Abbildung 9: Gewichtsverlauf der tumortragenden Tiere und Verlauf des mittleren Körpergewichtes der nicht-tumortragenden Tiere aller Gruppen

Die tumortragenden Tiere hingegen zeigten mit Ausnahme von Maus 6 eine ausgeprägte Kachexie. Das Gewicht der tumorös erkrankten Versuchstiere lag einen Tag vor ihrem Versterben bei durchschnittlich 17,00 g (min.-max.: 14 g -20 g).

4.1.5 Überleben

Von den insgesamt 24 Versuchstieren verstarben 3 Tiere aus der Gruppe 2 vor Ablauf der ersten 4 Tage. Bei der Sektion dieser Tiere fand sich eine Perforation der Harnblase, die mit entzündlichen Veränderungen des Peritoneums einherging, so dass ein Behandlungsfehler durch zu intensive Koagulation der Harnblase als Todesursache angenommen werden muss.

5 Tiere sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten an den Folgen ihres Tumorleidens verstorben. Bei ihnen fanden sich ausgeprägtes Tumorwachstum und Kachexie. Das mittlere Überleben dieser tumorös erkrankten Tiere betrug 66 Tage (min.-max.: 35 -103 Tage).

Nur eines der tumortragenden Tiere zeigte keinerlei Auffälligkeiten und wurde am Ende des Beobachtungszeitraumes geopfert.

Die übrigen Tiere sind nach den vor Versuchsbeginn festgelegten Kriterien geopfert worden. Sobald mindestens zwei Tiere einer Gruppe einen palpablen Tumor entwickelt hatten, bzw. sobald zwei Tiere verstorben waren, bei denen sich ein Tumor nachweisen ließ, kam es zur Opferrung der gesamten dazugehörigen Gruppe, unter der Annahme, dass unter gleichen experimentellen Bedingungen auch bei den restlichen Tieren dieser Gruppe bereits ein Tumor vorliegen müsste, der jedoch der Palpation entgeht. Am Tag 80 nach Tumorzellinstillation wurden die überlebenden Tiere der Gruppen 1 und 2 geopfert, da hier die festgelegten Kriterien erfüllt waren. Am Tag 115 erfolgte die Opferrung der überlebenden Mäuse der Gruppen 3 und 4. In beiden Gruppen fand sich zu diesem Zeitpunkt insgesamt nur ein sicher tumortragendes Tier, so dass die Kriterien zur Beendigung der Studie nicht erfüllt waren. Es wurde dann aber nachträglich die Annahme getroffen, dass Tumoren, die zu diesem Zeitpunkt nicht angewachsen waren auch nicht mehr anwachsen würden.

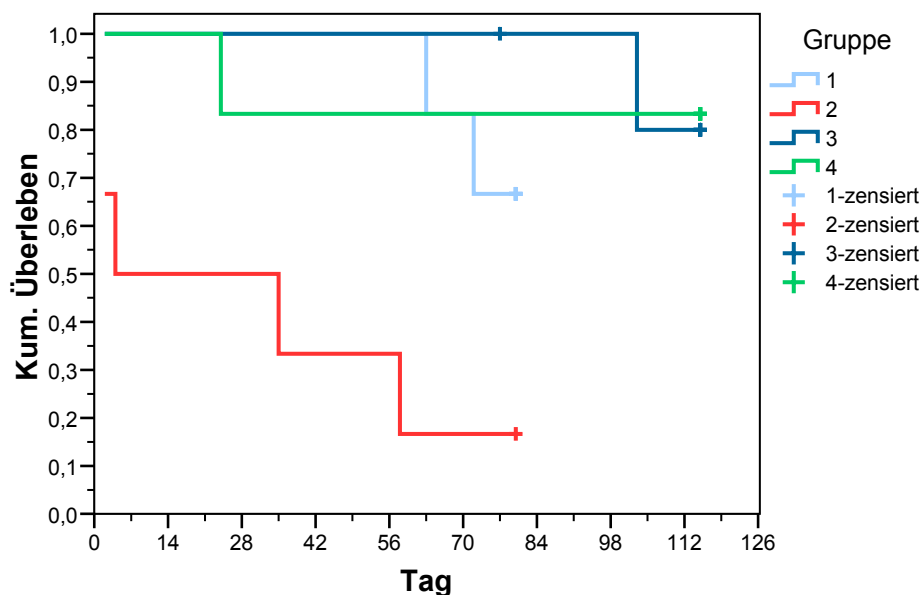


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die vier Gruppen. Die Zensur steht für die Opferrung an den Tagen 80 und 115.

4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der intravesikalen Instillation von humanen Harnblasentumorzellen der Linien EJ28 und T24 konnte eine maximale Tumoranwachsrate von 33% (95% KI: 9,7-70,0%) erreicht werden. Eine Erhöhung der Tumorzellkonzentration führte bei beiden verwendeten Zelllinien zu keinem Anstieg der Tumoranwachsrate.

Aufgrund des Fehlens einer Makrohämaturie fielen die tumorös erkrankten Tiere erst spät durch zunehmende Kachexie oder das Vorhandensein palpabler Tumoren auf.

4.2 Versuch 2

(Etablierung eines subkutanen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells)

4.2.1 Tumoranwachsrate

Das subkutane Blasentumor-Mausmodell zeigte für beide Zelllinien und für alle applizierten Zellzahlen eine Tumoranwachsrate von 100%. Im Gegensatz zum orthotopen Mausmodell ließen sich die Tumoren bereits nach 1-3 Tagen leicht unter der Haut der Tiere palpieren. Die Tumoren wurden nach Opferung der Tiere sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch verifiziert.

4.2.2 Tumorwachstum

In allen Versuchsgruppen kam es zu einem frühzeitigen Anwachsen der Tumoren, allerdings waren starke Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf das Einsetzen eines exponentiellen Tumorwachstums beobachtbar.

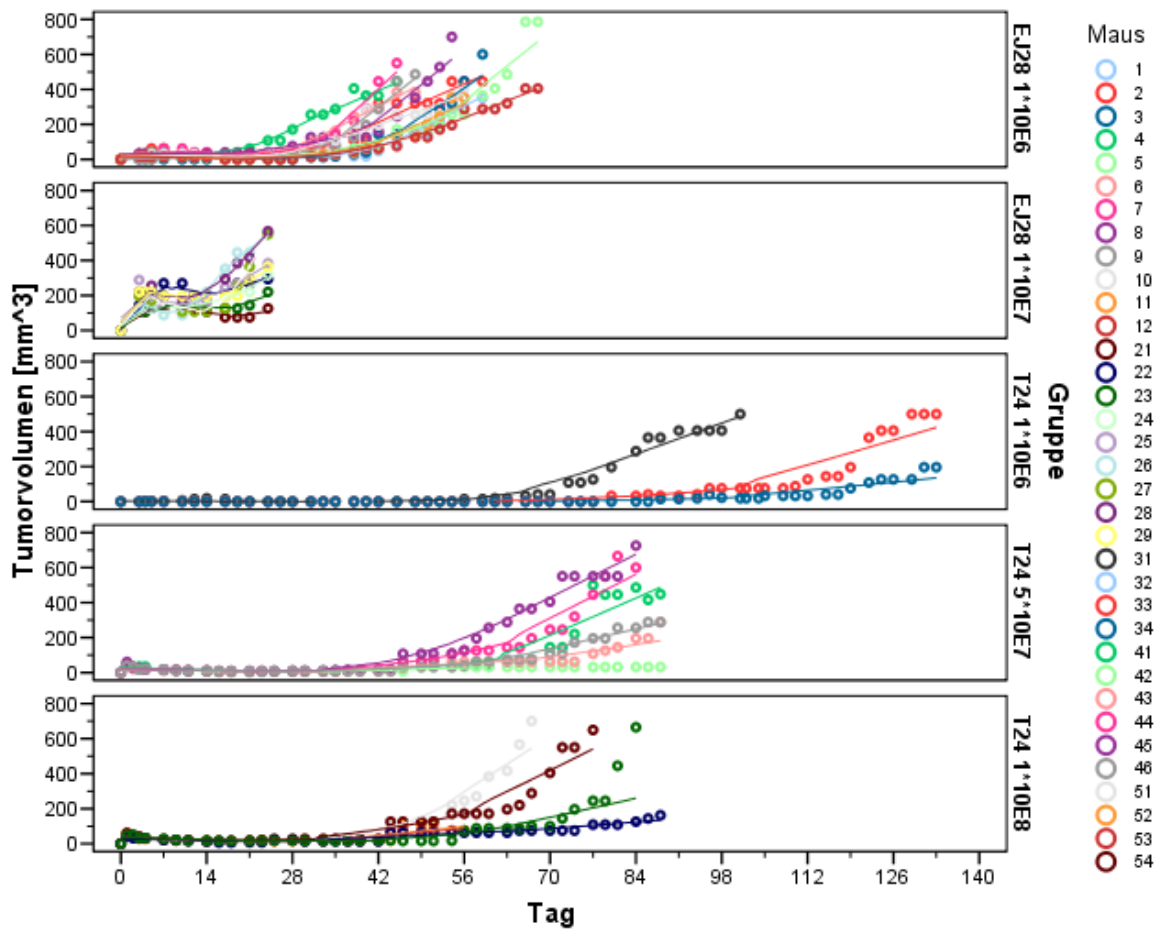


Abbildung 11: Mittleres Tumorstadium der einzelnen Mäuse im zeitlichen Verlauf, geordnet nach Gruppen/Zelllinien

Die Tumoren, die durch subkutane Injektion von T24-Tumorzellen induziert worden sind, wiesen nach ihrem Anwachsen eine zeitlich verzögerte Tumorprogression auf.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, kam es nicht vor Tag 63, 42 bzw. 35 in Gruppe 3, 4 bzw. 5 zu einem exponentiellen Tumorstadium bei der Mehrzahl der beobachteten Individuen. Da die geplanten Interventionsversuche mit Cisplatin über einen Zeitraum von 35 Tagen ab Applikation der Zellen geplant waren, und da in diesem Zeitraum exponentielles Tumorstadium stattfinden sollte, wurde das Tumorstadium der Zelllinie T24 in Gruppe 3, 4 und 5 als nicht geeignet für das gewünschte Tumormodell erachtet.

Die Implantation der Zelllinie EJ28 führte in beiden applizierten Zellzahlen zu einem früheren, progredienten Anstieg der Tumorstadiumskurve.

In Gruppe 2 kam es mehrheitlich zu einem derart schnellen Wachstum der Tumoren, dass die ersten Tiere bereits am Tag 24 nach Applikation der Tumorzellen geopfert werden mussten. Die Tumoren hatten zu dem Zeitpunkt ein nicht mehr vertretbar großes Volumen erreicht.

Bei Gruppe 1 setzte ein exponentielles Tumorstadium mehrheitlich ab Tag 21 ein. Erste Operationen mussten am Tag 45 durchgeführt werden. Die meisten Operationen erfolgten jedoch erst am Tag 59.

Für die geplanten Interventionsstudien am besten geeignet, erscheint ein Tumorstadium, welches in seinem Verlauf zwischen dem von Gruppe 1 und 2 liegt. Hierbei würde es zu einem frühzeitigen exponentiellen Wachstum ohne das Risiko eines verfrühten Sterbens der Versuchstiere kommen. Für die folgenden Studien kam daher ein Tumormodell mit subkutaner Applikation von 5×10^6 EJ 28-Zellen zum Einsatz.

4.2.3 Gewichtsverlauf

Am Tage vor der Tumorzellapplikation wiesen die Versuchstiere ein durchschnittliches Körpergewicht von 17,91 g auf (SA 1,50).

Wie Abbildung 12 zeigt, konnten die Tiere im Verlauf, bedingt durch Alterung und optimale Ernährungsbedingungen, ihr Gewicht leicht steigern. Versuchstiere mit Tumorstadium um 500 mm^3 fielen gegen Ende des Beobachtungszeitraumes durch Vigilanzminderung, Fellveränderungen wie Haarverlust oder struppiges Fell sowie Gewichtsabnahme auf.

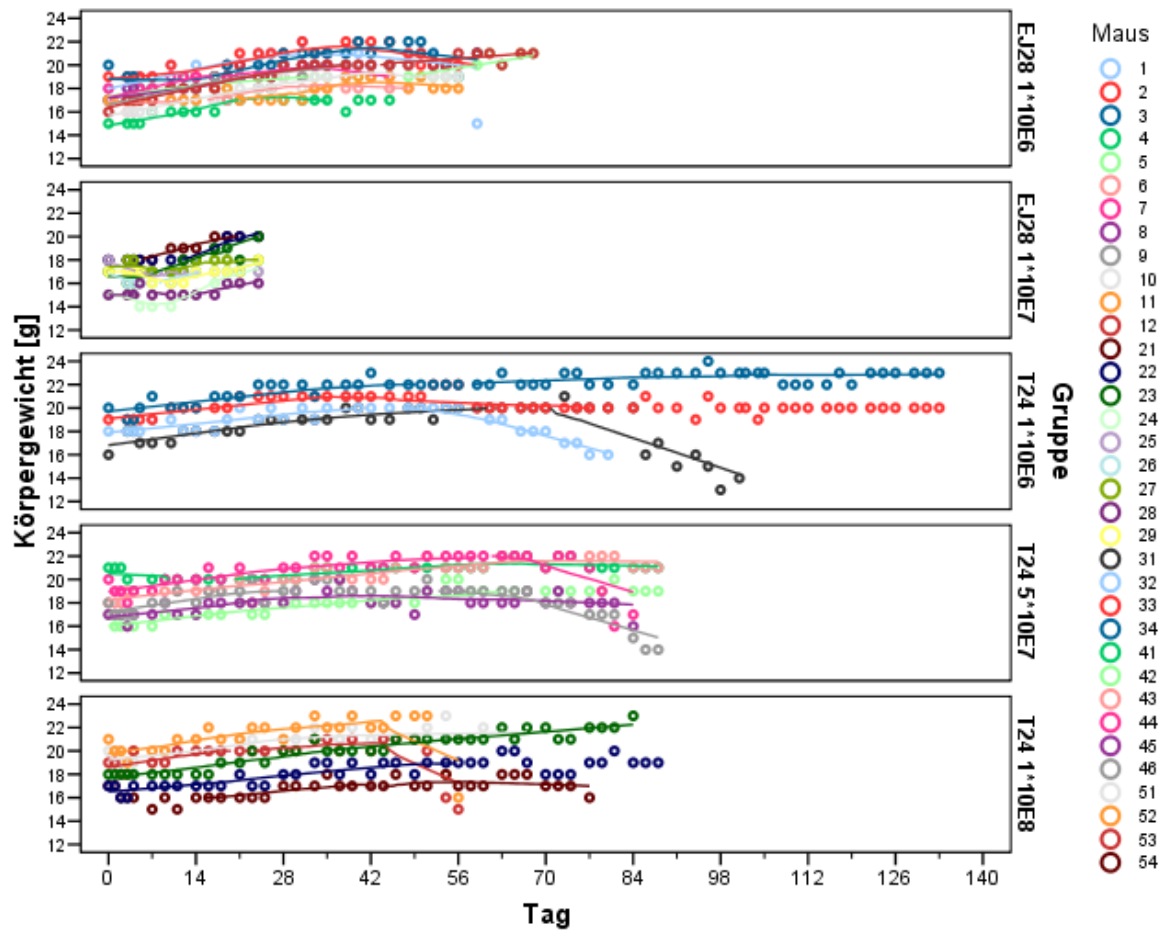


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts für jedes einzelne Tier, sortiert nach Gruppen

Abbildung 13 zeigt besonders deutlich den präfinal durch Tumorkachexie veränderten mittleren Gewichtsverlauf in den einzelnen Gruppen.

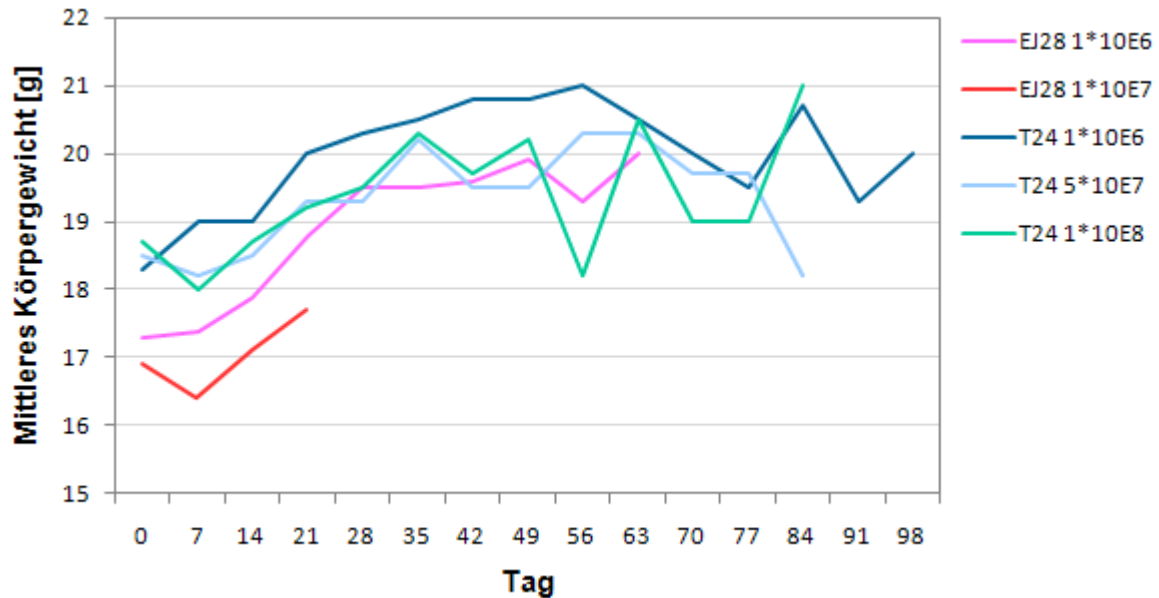


Abbildung 13: Mittleres Körpergewicht in den 5 Gruppen im zeitlichen Verlauf

Durch die geringe Fallzahl schlägt sich der Gewichtsverlust eines einzelnen Tieres deutlich im Kurvenverlauf nieder. Nach dem Tod dieses Tieres steigt das mittlere Körpergewicht dann wieder überproportional an.

In Gruppe 2 (EJ28, 1×10^7 Zellen) kam es, nach einer anfänglichen Phase des Gewichtsverlustes bis zum Tag 7, zu einem kontinuierlichen Anstieg des mittleren Körpergewichts. Trotzdem wiesen die Tiere einige Tage vor ihrem Tod bzw. vor ihrer Opferung Schwäche und Fellauffälligkeiten auf. In dieser Gruppe demaskierte anscheinend das schnelle Tumorwachstum den eigentlichen Gewichtsverlust der Tiere.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ein ideales Tumormodell für die geplanten Interventionsstudien ist durch subkutane Injektion von 5×10^6 Tumorzellen der Linie EJ28 im Flankenbereich der Versuchstiere geschaffen worden.

Das Gewichtsverhalten der Versuchstiere verringerte sich erst kurz vor ihrem Tod bzw. ihrer Opferung bei großen Tumorumfängen. Unmittelbar nach Injektion der Tumorzellen kam es dagegen nicht zu einer Beeinträchtigung der Tiere im Sinne von Schwäche.

4.3 Versuch 3

(Therapieversuch und Dosisfindung mit intraperitoneal appliziertem Cisplatin im subkutanen Blasen tumor-Mausmodell)

4.3.1 Gewichtsverhalten

Am Tage vor Applikation der Tumorzellen betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere in Gruppe 1 (NaCl) 21,60 g (SA 1,14). In den Gruppen 2 (Cisplatin 1,5 mg/kg KG) und 3 (Cisplatin 3,3 mg/kg KG) lag das Durchschnittsgewicht bei 22,00 (SA 1,67) bzw. 22,50 g (SA 2,59).

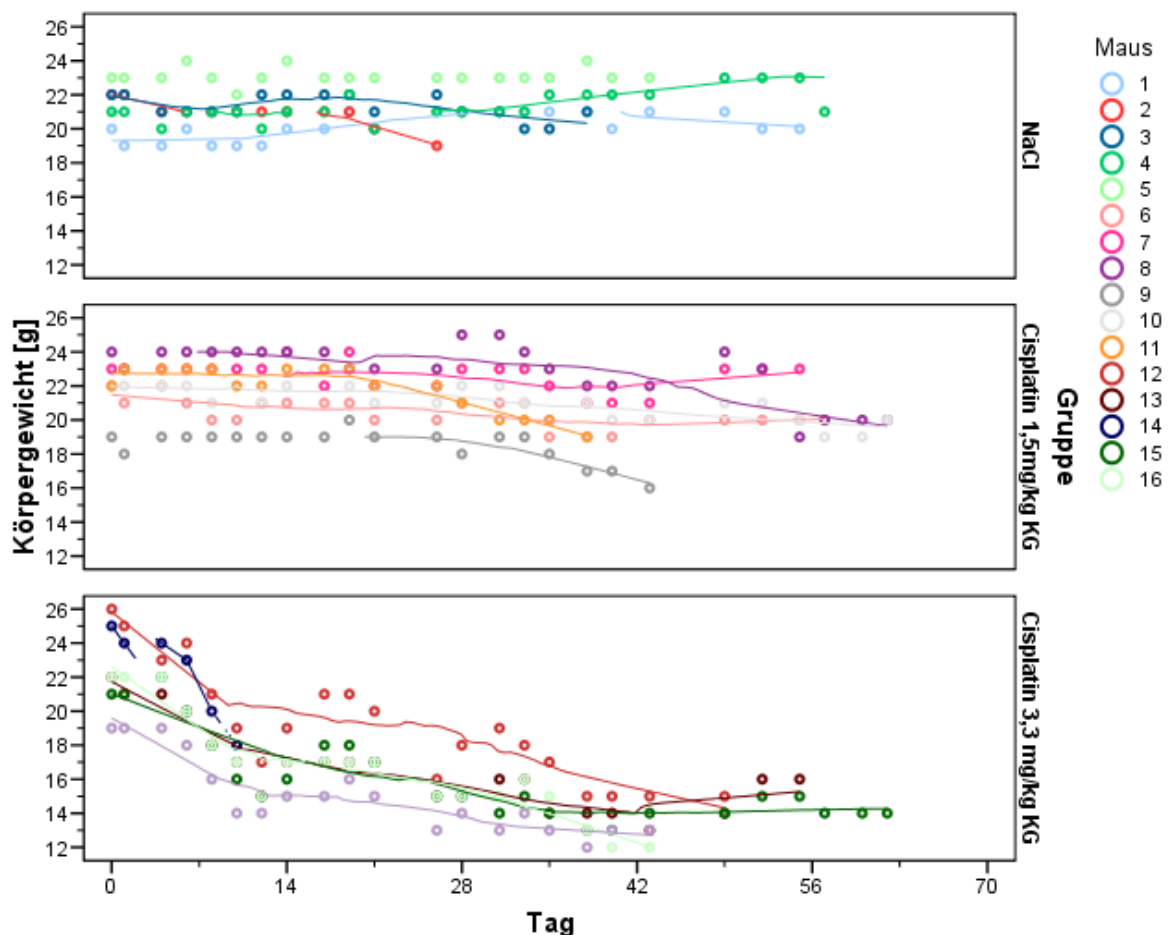


Abbildung 14: Körpergewicht jedes einzelnen Tieres im zeitlichen Verlauf, geordnet nach Gruppen

Während der Gewichtsverlauf in den Gruppen 1 und 2 im Beobachtungszeitraum weitestgehend konstant war, zeigte sich in Gruppe 3 ein zunehmender Gewichtsverlust, der sich unmittelbar nach Versuchsbeginn manifestierte.

Besonders deutlich wird diese Beobachtung bei Betrachtung der Kurven für das mittlere Körpergewicht der einzelnen Gruppen in Abbildung 15.

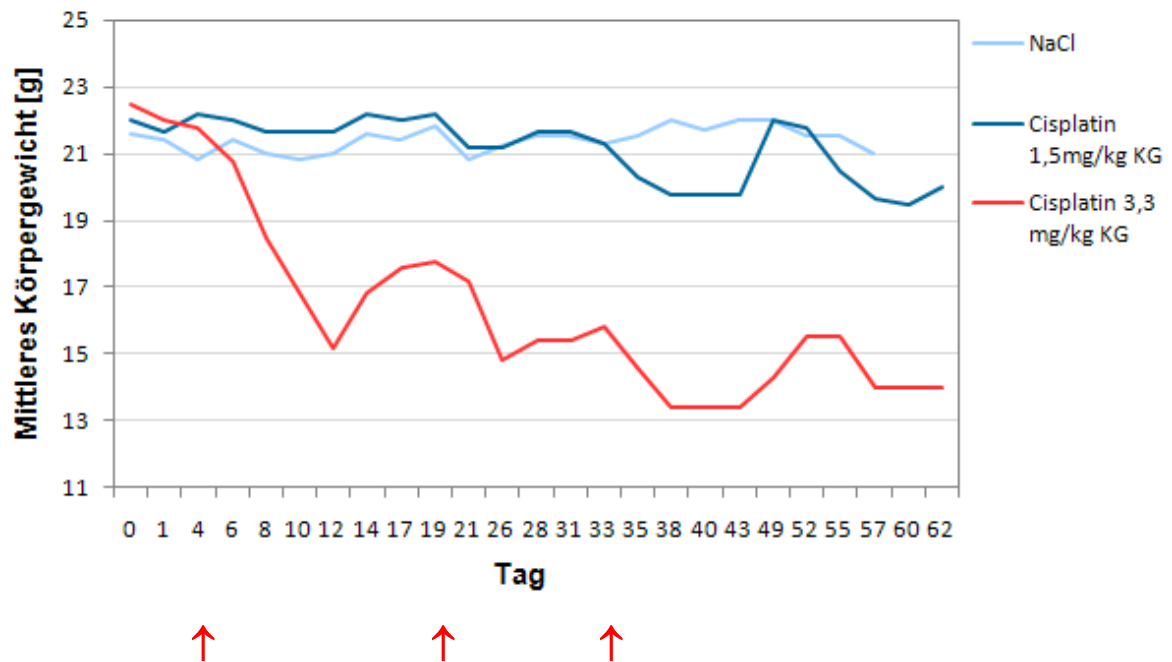


Abbildung 15: Verlauf des mittleren Körpergewichts in den einzelnen Versuchsgruppen. Die roten Pfeile markieren jeweils den ersten der drei aufeinander folgenden Therapietage.

Am Tag 12 betrug das Körpergewicht in den Gruppen 1 und 2 durchschnittlich 21,00 (SA 1,58) bzw. 21,67 g (SA 1,75) und lag damit nur knapp unter dem o.g. Startgewicht. In Gruppe 3 hingegen lag das mittlere Gewicht an diesem Tag bei 15,20 g (SA 1,10). Die Tiere hatten somit innerhalb von 12 Tagen mehr als ein Drittel ihres ursprünglichen Gewichtes verloren.

Im Kurvenverlauf der Abbildung 15 zeigt sich besonders bei Gruppe 3, dass ein schwaches Tier den Mittelwert herunterziehen kann, und dass es nach dem Versterben dieses Tieres wieder zu einem Gewichtsanstieg innerhalb der Gruppe kommt. Durch die geringe Fallzahl könnte sich somit der unregelmäßige Kurvenverlauf erklären.

Am Tag 57 lag das mittlere Körpergewicht in den Gruppen 1 und 2 bei 21,00 bzw. 19,67 g (SA 0,58). Das überlebende Tier der Gruppe 3 wog dagegen nur 14,00 g. Der präfinale Gewichtsverlust korrelierte, wie auch in Versuch 2 beobachtet, mit Fell auffälligkeiten und Vigilanzminderung.

Abbildung 15 zeigt, dass es besonders im Gewichtsverlauf der Gruppe 3 eine Abhängigkeit zwischen den Gewichtsveränderungen und den Therapietagen gibt. Jeweils nach Cisplatingabe an den Tagen 4, 5 und 6, 19, 20 und 21 sowie 33, 34 und 35 ergibt sich mit leichter zeitlicher Verzögerung von ein bis 2 Tagen ein deutlicher Rückgang des Gewichtes der Versuchstiere. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Gewichtsveränderung bei hochdosierter Cisplatingabe nicht primär vom Tumorleiden abhängt, sondern insbesondere auf die Nebenwirkung des Zytostatikums zurückzuführen sein könnte.

Aus der Varianzanalyse für Messwiederholungen ergeben sich ein signifikanter Effekt bezüglich des Gewichtes im zeitlichen Verlauf ($p < 0,001$), sowie signifikante Wechselwirkungen zwischen der Gewichtsveränderung und der Gruppenzugehörigkeit ($p < 0,001$) an den Tagen 1, 8, 21 und 35. Weiterhin ist ein signifikanter Gruppeneffekt zu diesen Zeitpunkten nachweisbar ($p = 0,013$).

Post-Hoc-Tests zeigen, dass sich Gruppe 3 signifikant von Gruppe 1 (Scheffé-Prozedur, $p = 0,040$) und Gruppe 2 ($p = 0,022$) unterscheidet, während zwischen Gruppe 1 und 2 bezüglich des Körpergewichtes kein Unterschied nachweisbar ist ($p = 1$).

4.3.2 Tumorwachstum

Da die injizierte Tumorzellzahl bei allen Tieren gleich war und mit der Therapie erst am Tag 4 begonnen wurde, entwickelten sich die Tumorumfänge in den unterschiedlichen Gruppen zunächst sehr ähnlich, wie die Abbildungen 16 und 17 zeigen.

Am Tag 1 nach Tumorzellimplantation betrug das Tumorumfang für die Gruppen 1, 2 und 3 durchschnittlich 36,25 (SA 7,68), 35,33 (SA 5,89) bzw. 36,90 mm³ (SA 5,87).

Am Tag 21 lag das mittlere Tumorumfang der Gruppen 1,2 und 3 bei 78,38 (SA 47,33), 75,75 (SA 81,66) bzw. 80,30 mm³ (SA 53,90).

Am Tag 35 wiesen die Gruppen Tumorumfänge von 288,63 (SA 169,23), 240,83 (SA 300,49) bzw. 244,30 mm³ (SA 101,64) auf.

Am Tag 57 betrug das Tumorumfangen in den Gruppen 1, 2 und 3 durchschnittlich 650,00, 498,50 bzw. 364,50 mm³.

Es zeigt sich, dass die Tumorumfangen der Gruppe 1 die größten Werte annahmen. Die Tumoren der mit Cisplatin therapierten Tiere hingegen wiesen geringere Volumina auf.

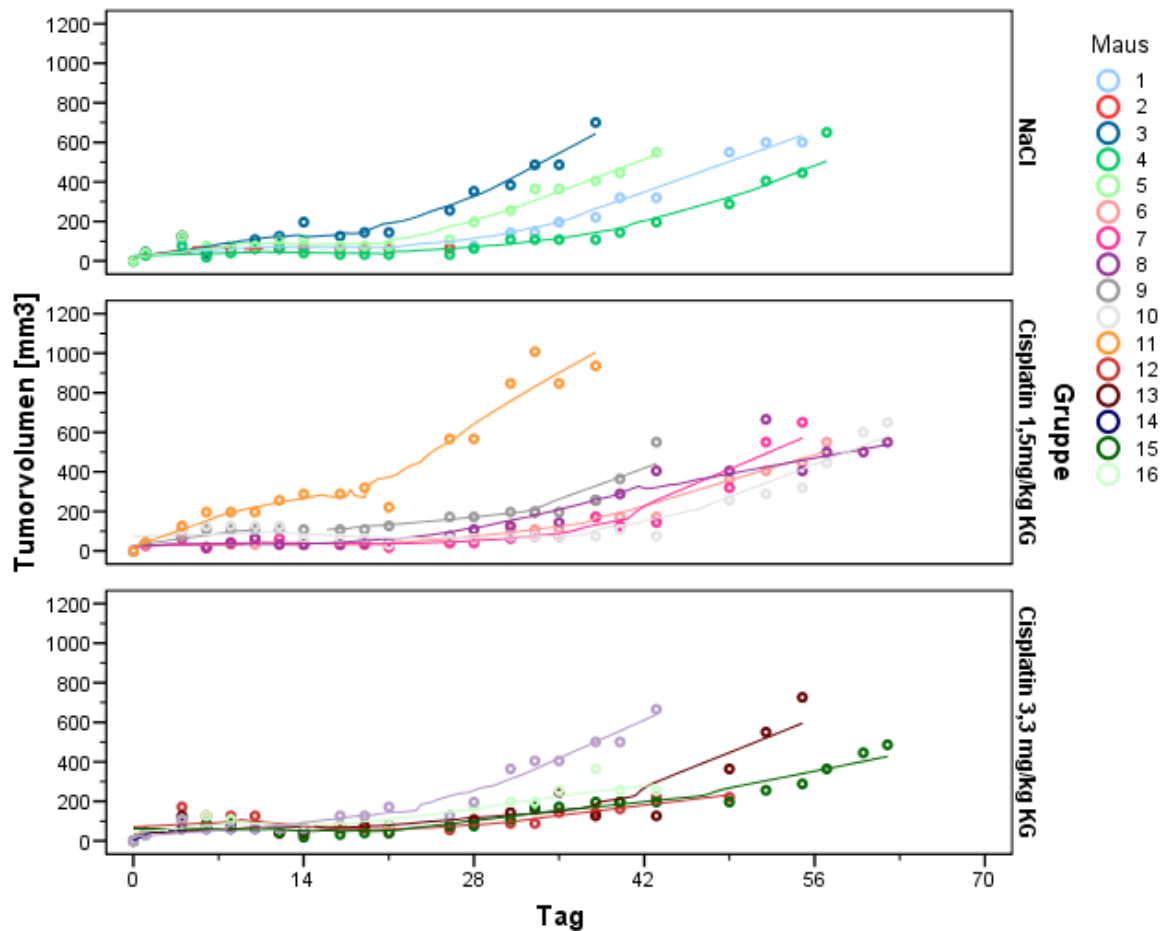


Abbildung 16: Tumorumfangen jedes einzelnen Versuchstieres im zeitlichen Verlauf, nach Gruppen sortiert. Die roten Pfeile markieren jeweils den ersten der drei aufeinander folgenden Therapietage.

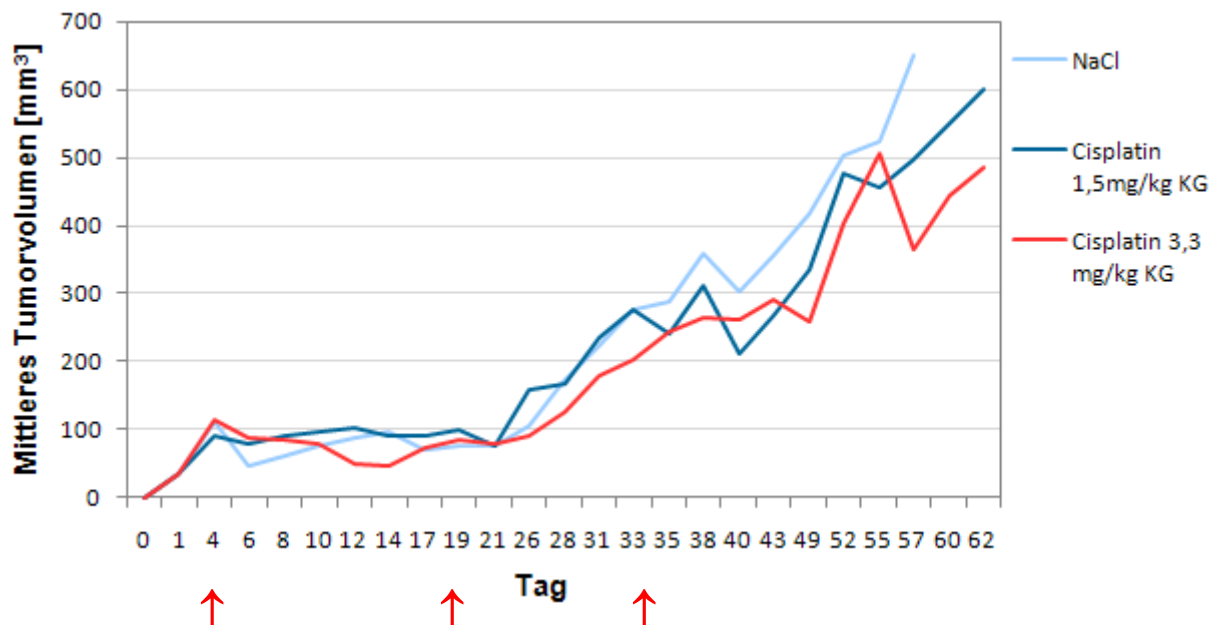


Abbildung 17: Entwicklung der mittleren Tumorstadiume der drei Gruppen im zeitlichen Verlauf. Die roten Pfeile markieren jeweils den ersten der drei aufeinander folgenden Therapietage.

Mithilfe der Varianzanalyse für Messwiederholungen lässt sich ein statistisch signifikanter Anstieg des Tumorstadiums an den Tagen 1, 8, 21 und 35 nachweisen (Greenhouse-Geisser-korrigiert, $p=0,002$). Wechselwirkungen zwischen den Gruppen können jedoch nicht beobachtet werden. Der Verlauf unterscheidet sich nicht (Greenhouse-Geisser-korrigiert, $p=0,888$), und auch ein Gruppenunterschied ist in diesem Beobachtungszeitraum nicht nachzuweisen (Scheffé, alle p -Werte liegen bei mindestens 0,993). Ursächlich für diese fehlende statistische Signifikanz könnte die geringe Fallzahl sein.

4.3.3 Überleben

In den Gruppen 1, 2 und 3 betrug das mittlere Überleben 43,80 (95% KI: 32,62 – 54,98), 52,83 (95% KI: 44,78 – 60,89) bzw. 43,67 Tage (95% KI: 29,23 – 58,10). Das mediane Überleben betrug 43,00 Tage in der Kontrollgruppe (95% KI: 32,27 – 53,74), 55,00 Tage in der Therapiegruppe mit der niedrigen Cisplatinosis (95% KI: 38,20 – 71,80) bzw. 43,00 Tage in der Therapiegruppe mit höherdosiertem Cisplatin (95% KI: 11,79 – 74,21).

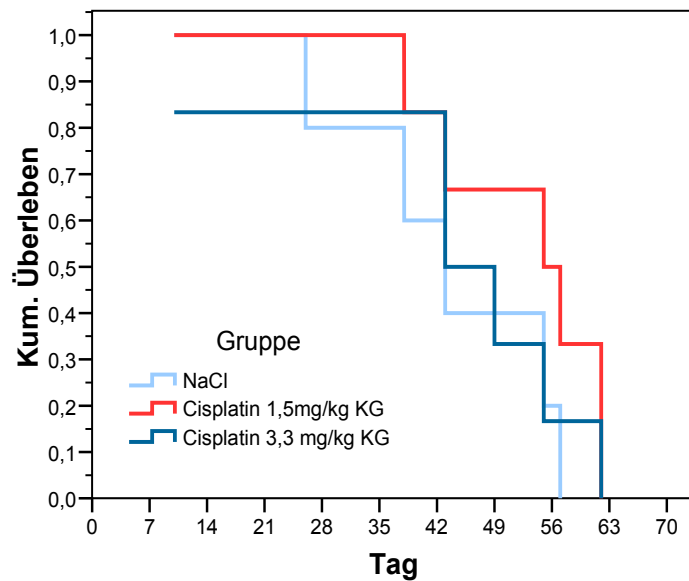


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für kumulatives Überleben (Tod und Opferung wurden als ein Ereignis zusammengefasst).

Das mittlere Überleben konnte demnach durch Therapie mit der niedrigen Cisplatindosis um 9 Tage im Vergleich zur Negativkontrolle verlängert werden. Die hohe Cisplatindosis führte zu einer geringfügigen Verringerung des mittleren Überlebens.

Das mediane Überleben verlängerte sich durch Therapie mit dem niedrigdosierten Zytostatikum um 12 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die hochdosierte Cisplatingabe hatte keinen Einfluss auf das mediane Überleben der Versuchstiere.

Bei der Testung auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Gruppen mittels Log-Rang-Test ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben der Tiere ($p=0,371$). Das Fehlen der statistischen Signifikanz könnte auch hier durch die geringe Fallzahl begünstigt worden sein.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die intraperitoneale Injektion von jeweils 1,5 mg/kg KG Cisplatin an den Tagen 4, 5, 6, 19, 20, 21, 33, 34 und 35 konnte eine Verringerung des Tumolvolumens sowie eine Verlängerung des mittleren und medianen Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden. Allerdings erreichte

der Effekt nicht statistisches Signifikanzniveau, vermutlich bedingt durch die geringe Fallzahl. Bei der niedrigdosierten Cisplatinbehandlung waren bezüglich des Gewichtes, der Vigilanz und des Fells der Versuchstiere keine unerwünschten Nebenwirkungen zu verzeichnen.

Die Behandlung mit Cisplatin in einer höheren Dosierung von 3,3 mg/kg KG brachte final die größte beobachtbare Verringerung der Tumorumfänge. Die Dosissteigerung führte jedoch zu einer körperlichen Beeinträchtigung der Versuchstiere.

4.4 Versuch 4

(Überprüfung des Effektes von intraperitoneal applizierten AS-ODN und siRNAs gegen die Targets hTERT, Survivin und VEGF als Monotherapie und in Kombination mit Cisplatin im subkutanen Blasen-tumor-Mausmodell)

4.4.1 Therapie mit AS-ODN

In den Gruppen der Versuchstiere, die mit AS-ODN gegen die Targets Survivin (AS-SVV286; Gruppe 1) und hTERT (ASt2331; Gruppe 2) behandelt worden waren, zeigte sich zunächst im Vergleich zur Kontrollgruppe (NS-K1; Gruppe 3) ein zeitlich verzögerter Anstieg der mittleren Tumorumfänge, wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist.

Während das mittlere Tumorumfang am Tag 7 nach Tumorzellimplantation in der Negativkontrollgruppe bei durchschnittlich 49,93 mm³ (SA 44,48) lag, betrug es bei den mit AS-SVV286 behandelten Tieren durchschnittlich 11,50 mm³ (SA 2,72) und bei den mit ASt2331 behandelten Versuchstieren 12,50 mm³ (SA 2,75).

Am Tag 35 betrug in Gruppe 3 das mittlere Tumorumfang 304,00 mm³ (SA 277,60), während die Tumorumfänge der Gruppen 1 und 2 mit durchschnittlich 6,25 mm³ (SA 15,31) bzw. 30,25 mm³ (SA 19,68) deutlich unter dem der Kontrollgruppe lagen.

Während es in der Gruppe 2 ab Tag 35 zu einem steten Anstieg des mittleren Tumorumfanges kam, zeigte sich unter Therapie mit AS-SVV286 eine Stagnation

des Tumorwachstums mit durchschnittlichen Volumina von 20 mm³ bis zum Zeitpunkt der Opfierung der Versuchstiere.

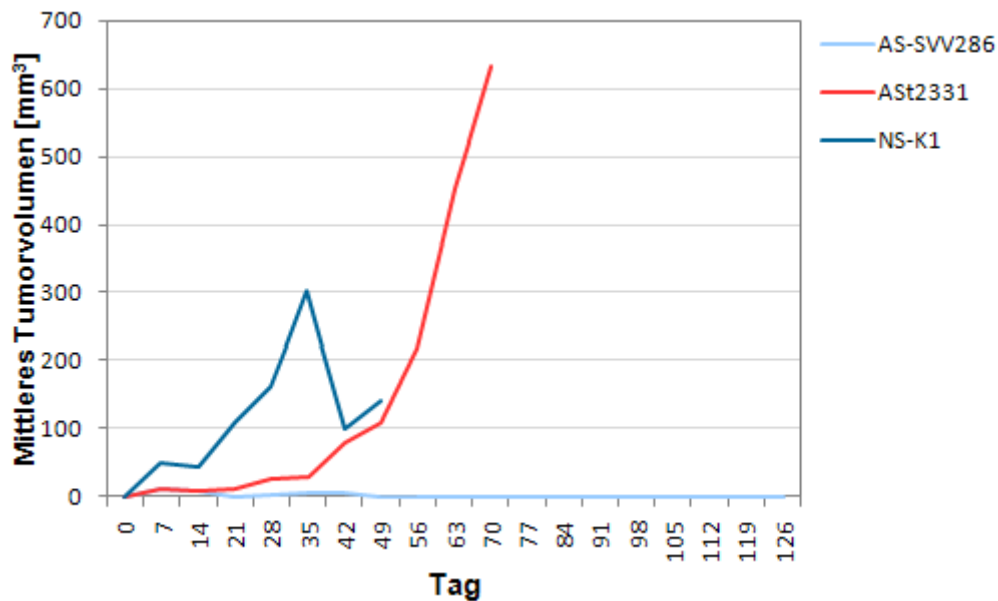


Abbildung 19: Entwicklung der mittleren Tumorumfassen in den beiden mit AS-ODN behandelten Gruppen sowie in der Negativkontrollgruppe (NS-K1)

Mit Hilfe eines gemischt linearen Modells kann geprüft werden, ob sich eine Veränderung des Tumorumfassen im zeitlichen Verlauf nachweisen lässt (dabei wird ein linearer Verlauf angenommen), und ob sich die jeweils gegenübergestellten Gruppen hinsichtlich der Tumorumfassen bzw. deren Veränderungen unterscheiden. Die Ergebnisse der Analysen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Gegenüberstellung		Zeitlicher Effekt	Gruppeneffekt
AS-ODN vs. Kontrolle	AS-SVV286 ASt2331 NS-K1	p<0,001	p=0,049

Tabelle 8: Ergebnisse des gemischt linearen Modells

Es zeigt sich sowohl ein statistisch signifikanter zeitlicher Effekt, als auch ein signifikanter Gruppeneffekt bei der Gegenüberstellung der drei Gruppen.

Das mittlere Überleben betrug für die mit AS-SVV286 therapierten Tiere 115,67 Tage (95% KI: 87,57 – 143,76), für die mit ASt2331 behandelten Tiere 49,86 Tage (95% KI: 35,31 – 64,41) und für die Kontrollgruppe 42,33 Tage (95% KI: 39,07 – 45,60).

Abbildung 20 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve für das Überleben in den drei Gruppen.

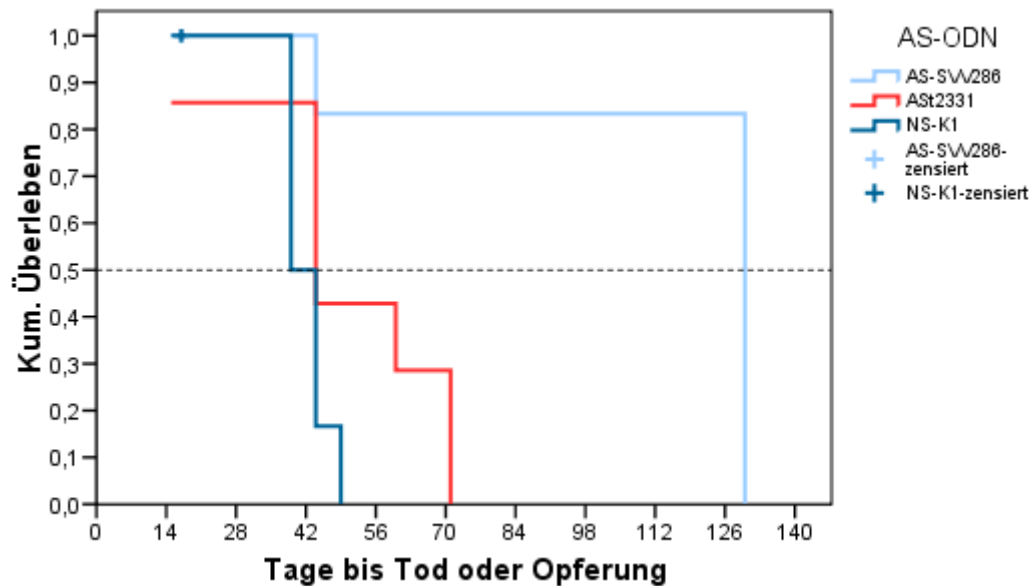


Abbildung 20: Kumulatives Überleben in den beiden mit AS-ODN behandelten Gruppen sowie in der Kontrollgruppe (NS-K1). Die Zensur steht für die Opfung einzelner Versuchstiere am Tag 17.

Im Log-Rang-Test lässt sich ein signifikanter Unterschied im Überleben der drei untersuchten Gruppen nachweisen ($p = 0,001$).

4.4.2 Therapie mit siRNAs

Bis Tag 14 nach Tumorzellimplantation zeigten die mit siRNAs behandelten Gruppen und die Kontrollgruppe (NS-si) ähnliche mittlere Tumorumfänge. Abbildung 21 gibt den zeitlichen Verlauf der mittleren Tumorumfänge in den 4 untersuchten Gruppen wieder.

An Tag 14 betrug das Tumorumfang in Gruppe 4 (si-SVV284) durchschnittlich $11,36 \text{ mm}^3$ (SA 1,93), in Gruppe 5 (si-hTERT2) $13,43 \text{ mm}^3$ (SA 7,21), in Gruppe 6 (si-VEGF) $10,71 \text{ mm}^3$ (SA 1,68) und in der Gruppe 7 (NS-si) durchschnittlich $9,93 \text{ mm}^3$ (SA 2,81).

An Tag 56 wies die mit si-VEGF behandelte Gruppe mit durchschnittlich 723,00 mm³ (SA 131,52) die größten Tumorumfänge auf. Zu diesem Zeitpunkt betrug das mittlere Tumorumfangen in der mit si-SVV284 behandelten Gruppe 498,00 mm³ (SA 67,88) und in der mit si-hTERT2 behandelten Gruppe 410,00 mm³ (SA 278,75). Am niedrigsten war das mittlere Tumorumfangen in der Kontrollgruppe. Am Tag 56 betrug es durchschnittlich 289,50 mm³ (SA 114,51).

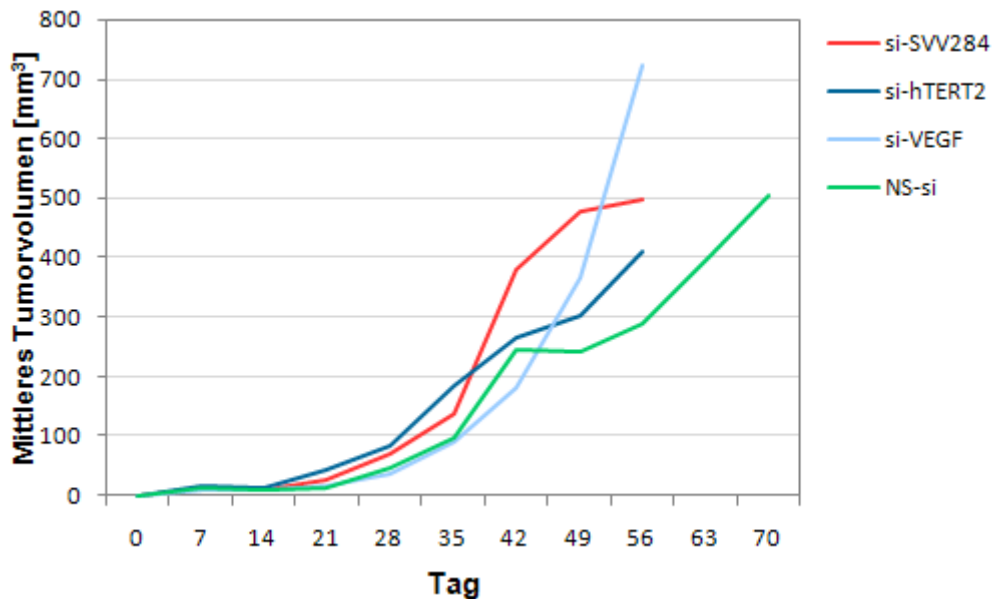


Abbildung 21: Entwicklung der mittleren Tumorumfänge in den drei mit siRNAs behandelten Gruppen sowie in der Kontrollgruppe (NS-si)

Die Tumormenge in den 4 Gruppen stieg statistisch signifikant im zeitlichen Verlauf ($p < 0,001$). Eine Unterscheidung des Tumorzustands nach Gruppen ist jedoch nicht ersichtlich (Tabelle 9).

Gegenüberstellung		Zeitlicher Effekt	Gruppeneffekt
siRNA vs. Kontrolle	si-SVV284 si-hTERT2 si-VEGF NS-si	$p < 0,001$	$p = 0,563$

Tabelle 9: Ergebnisse des gemischt linearen Modells

Das mittlere Überleben betrug in der mit si-VEGF behandelten Gruppe 46,83 Tage (95% KI: 40,75 – 52,92), in der mit si-SVV284 behandelten Gruppe 50,33 Tage (95% KI: 45,16 – 55,51) und in der mit si-hTERT2 behandelten Gruppe 50,67 Tage (95% KI: 44,19 – 57,14). In der Kontrollgruppe war das mittlere Überleben mit 55,17 Tagen (95% KI: 46,97 – 63,37) am längsten.

Abbildung 22 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve für das kumulative Überleben in den vier Gruppen.

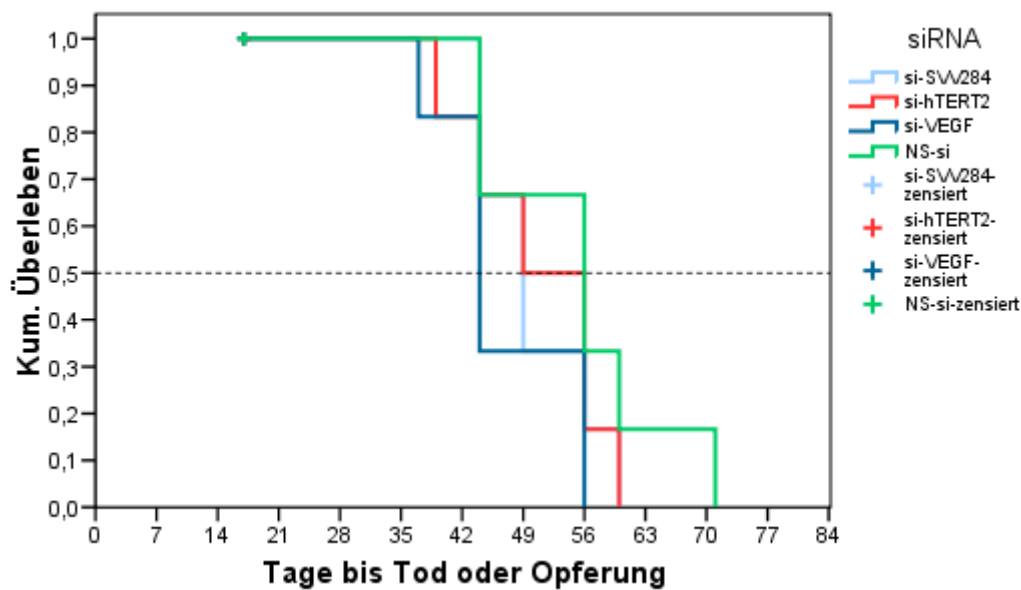


Abbildung 22: Kumulatives Überleben in den drei mit siRNAs behandelten Gruppen sowie in der Kontrollgruppe (NS-si). Die Zensur entsteht durch Opferung einzelner Tiere am Tag 17 für feingewebliche Untersuchungen.

Im Log-Rang-Test lässt sich hinsichtlich des Überlebens kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen ($p=0,340$).

4.4.3 Therapie mit AS-ODN plus Cisplatin

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen, dass sich durch Kombination der beiden eingesetzten AS-ODN mit Cisplatin keine weitere Reduktion des mittleren Tumolvolumens erzielen ließ. Stattdessen kam es in den Gruppen mit der Kombinationstherapie zu einem früheren und stärkeren Anstieg der mittleren Tumolvolumina.

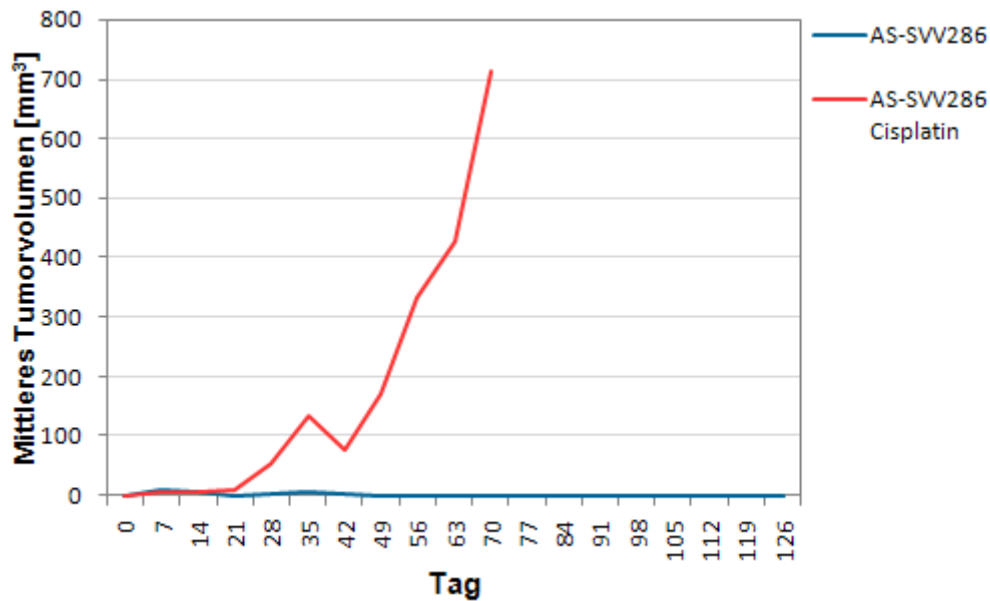


Abbildung 23: Entwicklung des mittleren Tumorstadiums in der mit AS-SVV286 behandelten Gruppe sowie in der mit AS-SVV286 plus Cisplatin behandelten Gruppe

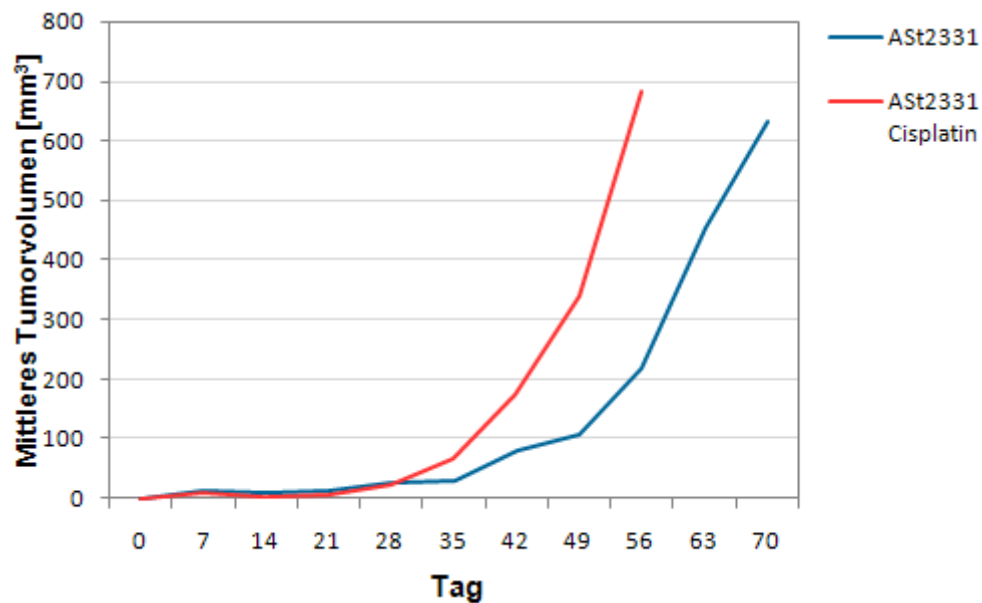


Abbildung 24: Entwicklung des mittleren Tumorstadiums in der mit ASt2331 behandelten Gruppe sowie in der mit ASt2331 plus Cisplatin behandelten Gruppe

Im gemischt linearen Modell lässt sich für die Gruppen AS-SVV286 und AS-SVV286 plus Cisplatin ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied nachweisen ($p < 0,001$).

Zusätzlich zeigen die Abbildungen 25 und 26, dass das mittlere Überleben durch Gabe von AS-ODN plus Cisplatin reduziert wurde.

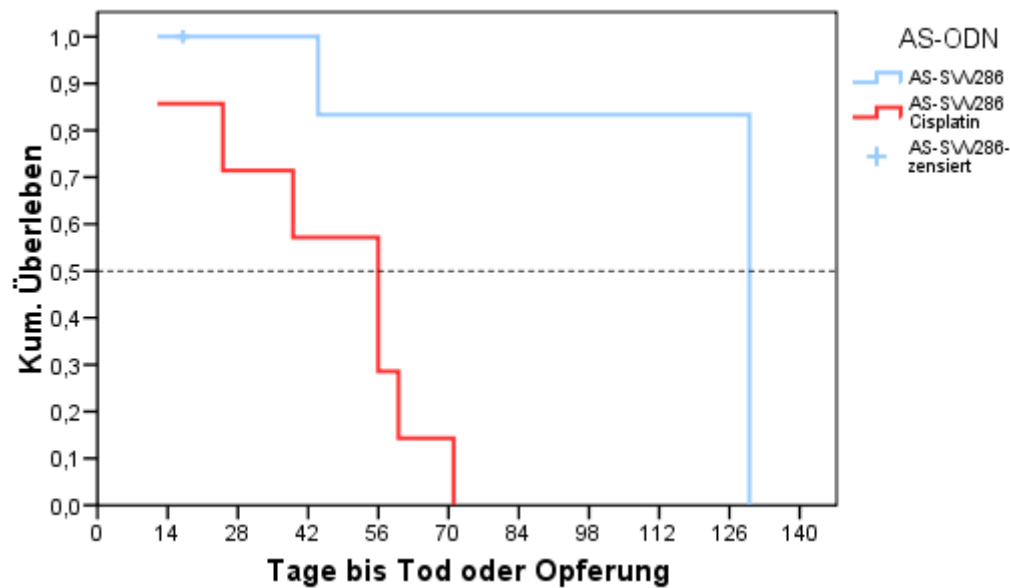


Abbildung 25: Kumulatives Überleben in der mit AS-SVV286 behandelten Gruppe sowie in der Gruppe mit Kombinationstherapie. Die Zensur entsteht durch Operation einzelner Tiere am Tag 17 für feingewebliche Untersuchungen.

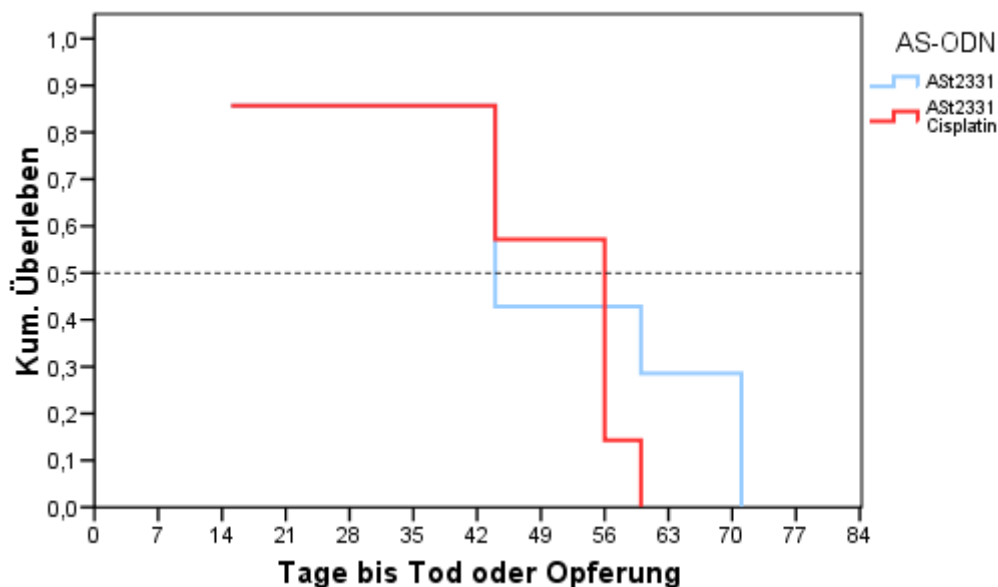


Abbildung 26: Kumulatives Überleben in der mit ASSt2331 behandelten Gruppe sowie in der Gruppe mit Kombinationstherapie. Die Zensur entsteht durch Operation einzelner Tiere am Tag 17 für feingewebliche Untersuchungen.

Für die mit AS-SVV286 behandelte Gruppe und die Gruppe mit der AS-SVV286 plus Cisplatin-Kombinationstherapie ist ein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben nachweisbar ($p=0,004$).

Die ASt2331- und die ASt2331 plus Cisplatin-Gruppen unterscheiden sich statistisch nicht hinsichtlich des Überlebens ($p=0,363$).

Die mit Cisplatin behandelten Tiere fielen durch Schwäche, Gewichtsverlust und Fellauffälligkeiten im Zuge der Therapie auf.

4.4.4 Therapie mit siRNAs plus Cisplatin

Die Abbildungen 27, 28 und 29 zeigen, dass durch die Kombination der siRNA-Therapie mit Cisplatin im Wesentlichen keine bedeutsame Reduktion der Tumorumfänge erreicht werden konnte. Lediglich durch Kombination von si-VEGF mit Cisplatin kam es kurz vor dem Versterben der Versuchstiere zu einem geringeren Anstieg des mittleren Tumorumfanges im Vergleich zur si-VEGF-Monotherapie. Dieser positive Effekt auf das Tumorstadium wurde jedoch von den Nebenwirkungen der Cisplatin-Therapie begleitet. Unter den Cisplatin-haltigen Kombinationstherapien wiesen alle Versuchstiere Fellauffälligkeiten, Schwäche und Gewichtsverlust auf.

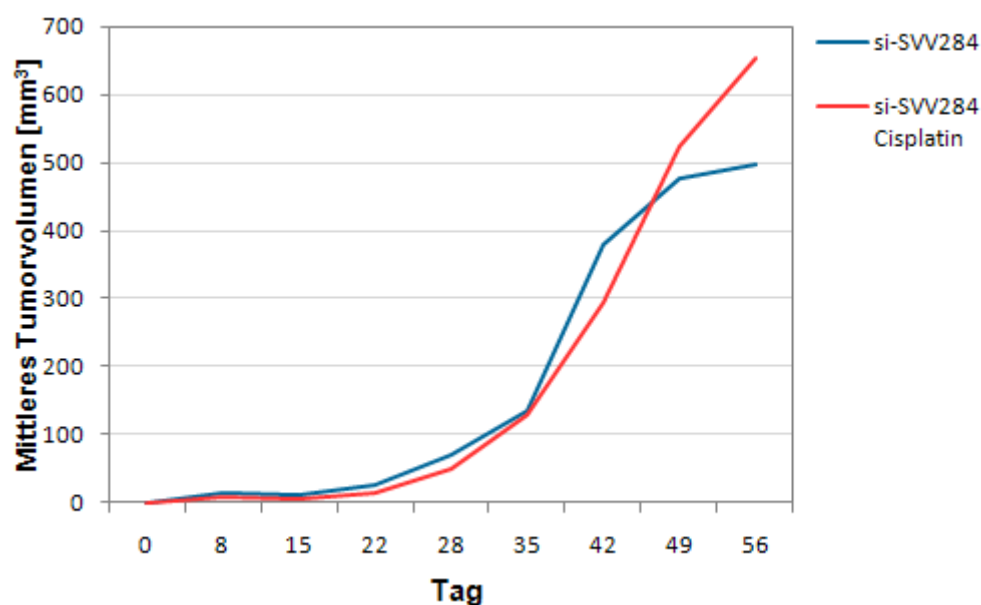


Abbildung 27: Entwicklung des mittleren Tumorumfanges in der mit si-SVV284 behandelten Gruppe sowie in der mit si-SVV284 plus Cisplatin behandelten Gruppe

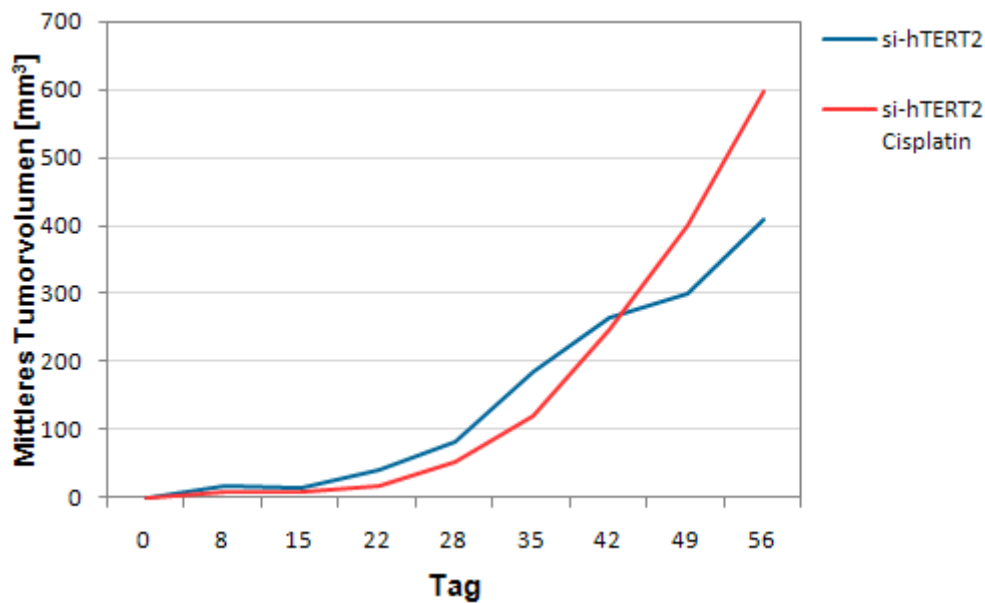


Abbildung 28: Entwicklung des mittleren Tumorzvolumens in der mit si-hTERT2 behandelten Gruppe sowie in der mit si-hTERT2 plus Cisplatin behandelten Gruppe

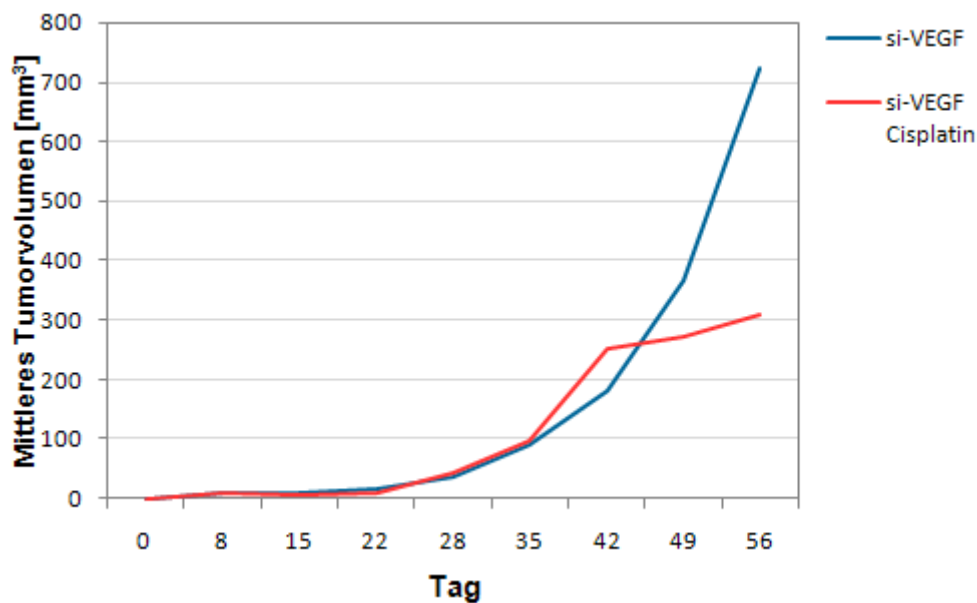


Abbildung 29: Entwicklung des mittleren Tumorzvolumens in der mit si-VEGF behandelten Gruppe sowie in der mit si-VEGF plus Cisplatin behandelten Gruppe

Während das mittlere Überleben in der mit si-SVV284 behandelten Gruppe 50,33 Tage (95% KI: 45,16 – 55,51) betrug, lag es in der Gruppe, die eine Kombination von si-SVV284 und Cisplatin erhielt, bei 52,50 Tagen (95% KI: 49,43 – 55,57). Dieser Unterschied im Überleben ist statistisch nicht signifikant (Log-Rang-Test, $p=0,732$).

Die si-hTERT2-Monotherapie resultierte in einem mittleren Überleben von 50,67 Tagen (95% KI: 44,19 – 57,14), während die Kombinationstherapie si-hTERT2 plus Cisplatin zu einem mittleren Überleben von 45,71 Tagen (95% KI: 34,91 – 56,52) führte. Auch dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Log-Rang-Test, $p=0,517$).

Die mit si-VEGF behandelte Gruppe schließlich wies ein mittleres Überleben von 46,83 Tagen (95% KI: 40,75 – 52,92) auf, während die Gruppe mit der entsprechenden Kombinationstherapie im Mittel 45,67 Tage (95% KI: 37,93 – 53,40) überlebte. Dieser Unterschied im Überleben ist wiederum nicht statistisch signifikant (Log-Rang-Test, $p=0,966$).

Die Abbildungen 30, 31 und 32 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven für kumulatives Überleben. In jeder Kurve findet sich jeweils das kumulative Überleben der Gruppe mit siRNA-Monotherapie sowie der Gruppe mit der entsprechenden Kombinationstherapie.

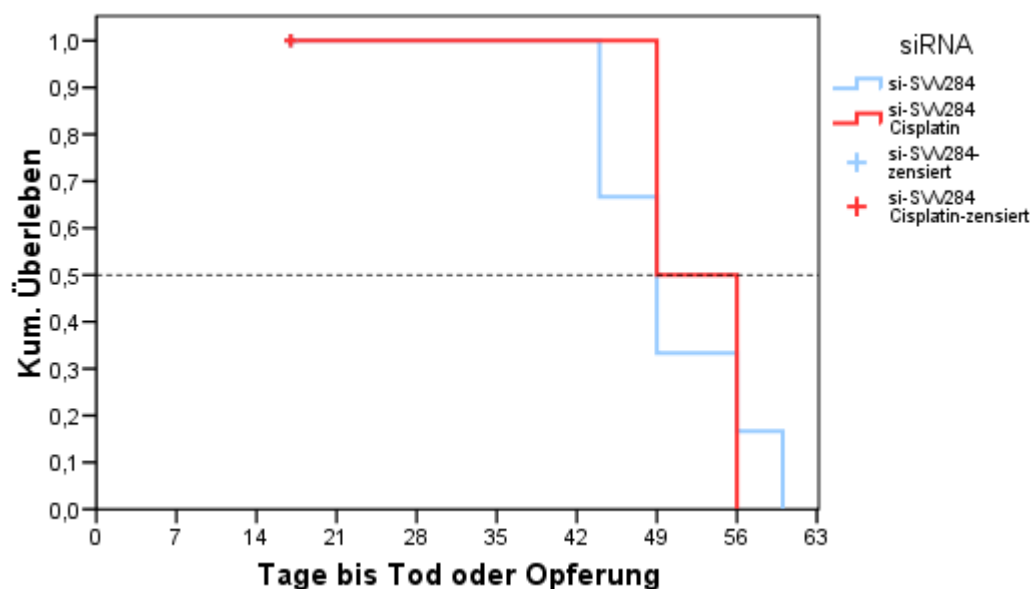


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve für die Gruppe mit si-SVV284-Monotherapie und für die Gruppe mit si-SVV284-Kombinationstherapie

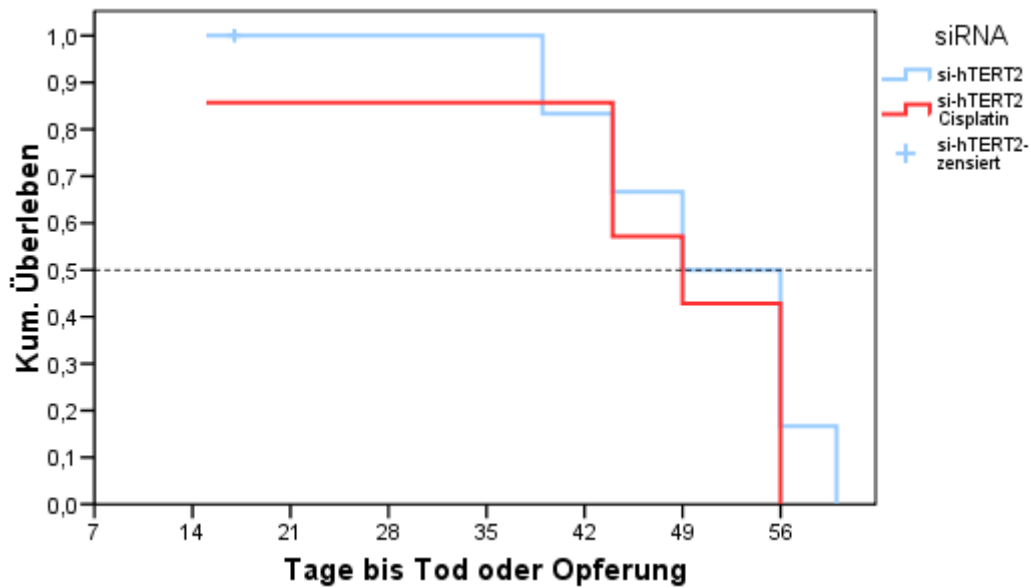


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve für die Gruppe mit si-hTERT2-Monotherapie und für die Gruppe mit si-hTERT2-Kombinationstherapie

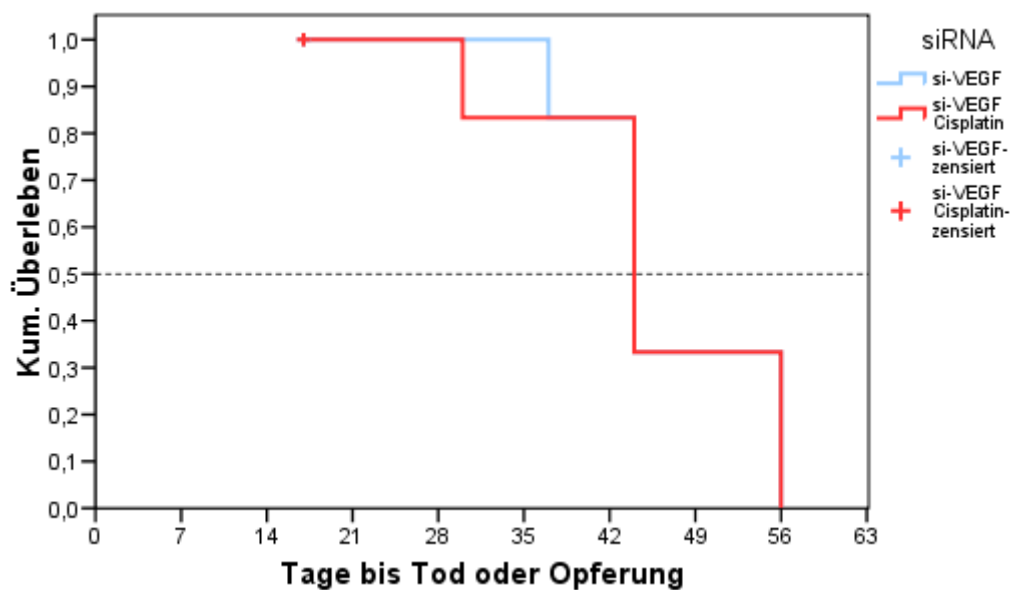


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve für die Gruppe mit si-VEGF-Monotherapie und für die Gruppe mit si-VEGF-Kombinationstherapie

4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die intraperitoneal applizierte AS-ODN-Monotherapie gegen die Targets Survivin und hTERT konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verringerung der Tumervolumina sowie eine Verlängerung des Überlebens erzielt werden. Diese

Veränderungen waren statistisch signifikant. Die Kombination der beiden AS-ODN mit Cisplatin führte zu keiner weiteren Tumorreduktion.

Durch die intraperitoneale Gabe von AS-SVV286 plus Cisplatin kam es zu einer statistisch signifikanten Verkürzung des Überlebens.

Die intraperitoneale Applikation von siRNAs gegen die Targets Survivin, hTERT und VEGF führte, verglichen mit der Negativkontrollgruppe, zu keiner Reduktion des Tumorumfanges. Auch das Überleben konnte durch die Monotherapien nicht positiv beeinflusst werden.

Durch die Kombination der siRNAs mit Cisplatin konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung des Tumorumfanges bzw. des Überlebens erzielt werden.

4.4.6 Weiterführende zellbiologische und molekulare Untersuchungen

Die im Rahmen von Versuch 4 entnommenen inneren Organe zeigten histologisch keinen Anhalt für Fibrose, Cholestase oder Nekrose.

QPCR-Analysen der Target-mRNA-Expression in den entnommenen Tumoren zeigten eine Reduktion der SVV-mRNA nach der Behandlung mit si-SVV284, nicht jedoch nach Behandlung mit AS-SVV286. Für VEGF und hTERT wurden keine Veränderungen der mRNA-Expression gefunden.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Target-Protein-Expression.

Die CD31-Färbung zeigte keine oder nur geringe Vaskularisation in den untersuchten Tumoren.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie die Aufnahme von intraperitoneal applizierten, FITC-markierten AS-ODN in Tumorgewebe untersucht. Dazu wurden SCID-Mäusen mit einem subkutanen EJ28-Zell-Tumor 5mg/kg KG FITC-markierte AS-ODN intraperitoneal injiziert. 12 – 80 Stunden nach dieser Injektion erfolgte die Fluoreszenz-Mikroskopie. Dabei wurden die stärksten Signale 24 Stunden nach der Behandlung mit dem AS-ODN registriert. Die Durchflusszytometrie wies 24 Stunden nach der Behandlung eine

Aufnahme der AS-ODN in 48% der Tumorzellen nach und zeigte im weiteren zeitlichen Verlauf einen deutlichen Rückgang.

Die *in vivo*-Aufnahme FITC-markierter siRNAs in Tumorzellen wurde nach dem gleichen Verfahren überprüft. Dabei zeigte sich 12 Stunden nach intraperitonealer Injektion eine maximale Penetration in die Randbereiche der Tumoren. Zu späteren Zeitpunkten ließ die Fluoreszenz-Intensität nach. Facs-Analysen von aus Tumor, Leber und Nieren gewonnenen Gewebeproben nach der siRNA-Behandlung zeigten nur geringe FITC-Fluoreszenz-Signale.

Die *in vivo*-Aufnahmestudien mit FITC-markierten AS-ODN und siRNAs zeigten, dass die intraperitoneal applizierten Konstrukte die peripheren Zellschichten der Tumoren auch ohne Verwendung eines Carriers penetrieren konnten.

5 DISKUSSION

5.1 Tumormodelle

Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen unterliegen einer ständigen Weiterentwicklung. In den letzten Jahren wurden zahlreiche tumorassoziierte Genveränderungen, die für die Krankheitsentstehung von Bedeutung sein könnten, identifiziert. Die Erforschung dieser Genveränderungen und Erkenntnisse über deren Bedeutung bei der Signaltransduktion in Tumorzellen eröffnen völlig neue Behandlungsmöglichkeiten. Mit molekularen Therapien kann direkt in die veränderten Signalwege in Tumorzellen eingegriffen werden und Tumoren somit gezielt und ursächlich behandelt werden. Diese neuen Behandlungsstrategien könnten die Behandlung von Tumoren, die auf konventionelle Therapie schlecht ansprechen, ermöglichen. Außerdem könnten durch den spezifischen Ansatz an Tumorzellen gesunde Zellen geschont und so Nebenwirkungen der Therapie verringert werden. Um langfristig die Behandlung krebserkrankter Menschen zu optimieren, müssen neue Substanzen, die sich im Rahmen von *in vitro*-Versuchen als wirkungsvoll erwiesen haben, in präklinischen Studien an Tieren getestet werden. In weiterer Folge können dann vielversprechende Substanzen in die Phase I der klinischen Testung gehen.

In der gegenwärtigen Arbeit sollte ein orthotopes, humanisiertes Harnblasentumor-Mausmodell für präklinische Therapiestudien etabliert werden. Der gewählte Ansatz wirft zwangsläufig die Frage nach der Extrapolierbarkeit von Erkenntnissen an der Maus auf den Menschen auf, schließlich stellen Mensch und Maus unterschiedliche Spezies dar. Cubota et. al. zeigten diesbezüglich, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften unterschiedlicher Chemotherapeutika, einschließlich Cisplatin, bei Menschen und Mäusen sehr ähnlich waren. [41]

Der Versuch zur Etablierung eines orthotopen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells ist in Anlehnung an das von der Arbeitsgruppe um Böhle et al. etablierte und optimierte orthotope syngene murine Blasenkarzinommodell MB49 durchgeführt worden. Während diese Arbeitsgruppe ihr Modell in mehreren Publikationen bei experimentellen Therapieversuchen des Blasenkarzinoms

erfolgreich einsetzen konnte [34,35,36], zeichnete sich das im Rahmen dieser Dissertation untersuchte Modell durch eine geringe Tumoranwachsrates aus. Ursächlich für die geringe Tumoranwachsrates könnte eine zu geringe Verweildauer der Tumorzellsuspension in der Blase der Versuchstiere sein. Während die Tumorzellen beim optimierten MB49-Modell drei Stunden in der Harnblase verblieben, betrug die Verweildauer in dem Modell der vorliegenden Arbeit durchschnittlich nur eine Stunde. Dieser verkürzte Kontakt zwischen Blasenepithel und Tumorzellsuspension könnte das Anwachsen der Tumoren beeinträchtigt haben.

Vor Instillation der Tumorzellen erfolgte eine monopolare Elektrokoagulation der Harnblasen der Versuchstiere. Die bei Böhle et. al als komplikationslos beschriebene Koagulation auf geringster Stufe des Elektrotoms (5 W) führte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei mehreren Versuchstieren zu einer Perforation der Blase und zu einem frühzeitigen Versterben. Ursächlich für die erhöhte Empfindlichkeit des Blasengewebes gegenüber der Koagulation, bzw. der Tiere gegenüber der Koagulationsnekrose, könnte der Immundefekt der Versuchstiere sein.

Eine weitere Erklärung für die geringe Tumoranwachsrates könnte sein, dass das Urothel der SCID-Mäuse, z.B. aus molekularbiologischen Gründen, für das Anwachsen der instillierten Tumorzellen nicht geeignet ist. Eine vorangegangene Studie zeigte zwar, dass sich SCID-Mäuse besonders für den Einsatz in subkutanen Tumor-Mausmodellen eignen [42], es sind aber keine Untersuchungen zum Anwachsen von Tumoren der Zelllinien EJ28 und T24 am Urothel von SCID-Mäusen veröffentlicht.

Theoretisch wäre ein orthotopes, humanisiertes Harnblasentumor-Mausmodell am Besten geeignet, um menschliche Blasenkarzinomerkrankungen möglichst realitätsnah im Tiermodell zu untersuchen. Unter der Verwendung eventuell anderer Tumorzelllinien bzw. höherer Zellkonzentrationen sollte die Etablierung eines derartigen Modells in Folgestudien erneut versucht werden.

Da die Etablierung eines orthotopen Tumormodells im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolglos war, bzw. die Tumoranwachsraten als zu gering erachtet wurden, erfolgte ein Wechsel des Tumormodellsystems auf ein humanisiertes, subkutanes Harnblasentumor-Mausmodells. Auch wenn subkutane Modelle weniger die realen Verhältnisse im menschlichen Organismus widerspiegeln, haben sie sich dennoch in zahlreichen präklinischen Studien bewährt. [37,39] Der entscheidende Vorteil des hier etablierten subkutanen Tumormodells besteht darin, dass den Tieren humane Tumorzelllinien implantiert wurden. In Harnblasentumormodellen anderer Arbeitsgruppen wurden bislang überwiegend murine Zellen zur Implantation verwendet.

5.2 Chemotherapie mit Cisplatin

Platinhaltige Chemotherapeutika sind derzeit aus der Therapie des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms nicht wegzudenken. Aus diesem Grunde diente der Dosisfindungsversuch dem Zweck, eine Positivkontrolle für die dann folgenden Interventionsstudien mit den Testsubstanzen zu etablieren. Grundlage für das gewählte Studiendesign bildete eine Publikation von Citro et al.. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt einer intraperitonealen Cisplatingabe in verschiedenen Dosierungen an Nacktmäusen und konnte mit Dosierungen von 1,5 und 3,3 mg/kg KG eine Tumorreduktion von bis zu 50% im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollgruppe verzeichnen. Diese Untersuchung erfolgte jedoch im Gegensatz zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im nicht-humanisierten, subkutanen Tumormodell. [39]

In der vorliegenden Arbeit zeigte die intraperitoneale Cisplatingabe in Dosierungen von 1,5 und 3,3 mg/kg KG jedoch eine schwächere antitumorale Wirkung. Durch Erhöhung der Dosis des Therapeutikums konnte die Wirksamkeit nur geringfügig verbessert werden, gleichzeitig nahmen die unerwünschten Nebenwirkungen stark zu.

Im Gegensatz zu Citro et al. zeigte sich in drei weiteren Studien eine antitumorale Wirkung im subkutanen Tumor-Mausmodell erst bei Cisplatindosierungen im Bereich von 5-10 mg/kg KG. [43]

Johansson et al. registrierten mit Dosissteigerung eine Zunahme der Cisplatin-DNA-Adduktbildung, die überwiegend für die Wirkung des Chemotherapeutikums verantwortlich gemacht wird. [43]

Bei der Cisplatintherapie ist neben der Dosisgröße aber auch die Verabreichungsfrequenz von Bedeutung. Durch Verlängerung der therapiefreien Intervalle hätte möglicherweise die mit Erhöhung der Therapiedosis einhergehende, gesteigerte Toxizität vermindert werden können. Die Versuchstiere hätten durch längere Regenerationsphasen mehr Zeit, um sich von Schwäche und Gewichtsverlust zu erholen. Es ist zu überlegen, ob die Gabe höherer Einzeldosen in größeren zeitlichen Abständen eine effizientere Therapie ermöglicht hätte. Gegen ein solches Therapieregime könnte jedoch das in der therapiefreien Zeit eventuell schneller voranschreitende Tumorstadium sprechen.

Möglicherweise hätte aber auch die tägliche Gabe geringerer Cisplatin Dosen eine bessere Tumorthherapie ermöglicht. Marcu et al. wiesen in klinischen Studien an Patienten mit Kopf- und Hals-Karzinomen nach, dass eine niedrigdosierte, tägliche Cisplatintherapie eine bessere Tumorkontrolle bei geringerer Toxizität erbrachte als die wöchentliche, hochdosierte Gabe. [44]

Eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Wirksamkeit der Cisplatintherapie könnte eine schlechte Resorption des Wirkstoffes nach intraperitonealer Injektion sein. In diesem Zusammenhang wäre zu überlegen, ob eine intravenös applizierte Therapie der intraperitonealen überlegen sein könnte.

Mannel et al. publizierten eine der wenigen Arbeiten, die die Effektivität dieser beiden Darreichungsformen von Cisplatin vergleichen. Die Studie zeigte, dass die intraperitoneale Cisplatintherapie der intravenösen bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms im murinen Tumormodell überlegen war. [45] Eine andere Studie zeigte jedoch, dass die intraperitoneale Darreichungsform, verglichen mit der intravenösen, zu geringeren Spitzenkonzentrationen im Plasma führte. [46]

In Anbetracht der unzureichenden Datenlage wäre eine Untersuchung der beiden Darreichungsformen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in zukünftigen Studien sinnvoll.

Der geringe antitumorale Effekt könnte schließlich durch Resistenzmechanismen begründet sein. Die Resistenz menschlicher Tumorzellen gegenüber

Chemotherapien wird Genmutationen, Genamplifikationen oder epigenetischen Veränderungen zugeschrieben. Diese Veränderungen können die Aufnahme oder den Metabolismus der Therapeutika beeinflussen. Chemotherapeutika zeigen eine verminderte Wirkung bei Tumoren mit geringer Vaskularisation. Die verminderte Penetration der Chemotherapeutika in das Tumorgewebe könnte somit ein weiterer Grund für den geringen therapeutischen Effekt von Cisplatin im vorliegenden Tumormodell sein. [47]

Vor dem Hintergrund des Nebenwirkungsspektrums von Cisplatin und in Anbetracht der Zulassungserweiterung neuartiger Chemotherapeutika wäre zu überlegen, ob der Einsatz von Taxanen oder Gemcitabin bessere Therapieergebnisse in den vorliegenden Versuchen erbracht hätte. Kosugi et al. konnten nach intravenöser Applikation von Paclitaxel im murinen Harnblasentumor-Modell beispielsweise eine Suppression des Tumorwachstums auf 35,8%, verglichen mit dem Tumorwachstum der Kontrollgruppe, nachweisen. [48]

5.3 hTERT – ein Antitumortarget?

Die Erkenntnisse über Bestandteile, Funktion und Regulation des Enzyms Telomerase haben in den vergangenen Jahren zugenommen und bieten heute eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten zur Hemmung der Aktivität der Telomerase.

Insbesondere die Studien zur mTR „knock-out“-Maus von Blasco et al. konnten die Bedeutung der Telomerase für die Zellproliferation zeigen. Bei diesen Mäusen sind beide Allele der Telomerase-RNA ausgeschaltet worden. Diese mTR-negativen Mäuse entwickelten sich innerhalb der ersten sechs Generationen relativ symptomfrei. Es ließen sich jedoch mit jeder Generation zunehmende, deutliche Telomerverkürzungen beobachten, einhergehend mit Aberrationen und Fusionen von Chromosomen. In der siebten Generation traten dann Veränderungen in stark proliferierenden Geweben wie Hoden, Knochenmark und Milz auf. [49,50]

Das Auftreten der Schädigungen erst nach einer sogenannten „Lag“- Phase von sieben Generationen bestätigt die Hypothese, dass eine Inhibierung der Telomerase erst nach Verkürzung der Telomere wirksam wird. Menschliche Zellen haben mit 3-10 Kilobasen (kb) eine wesentlich geringere Telomerlänge als Mäuse mit ungefähr 40 kb, was den potentiellen Einsatz von Hemmstoffen gegen die Telomerase sicherlich vereinfacht.

Mit der Identifizierung der katalytischen Untereinheit hTERT gelang es, durch Expression einer mutierten, inaktiven katalytischen Untereinheit eine Hemmung der Telomerase und die Induktion des Zelltodes in menschlichen Zellen hervorzurufen. [51,52] Diese Studien zeigten erstmalig, dass das Telomeraseprotein einen möglichen Angriffspunkt zur Hemmung der Telomerase darstellt.

Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass die Telomerasehemmung immuntherapeutisch von Nutzen sein könnte. Die Telomerase wird von einer großen Anzahl menschlicher Tumoren exprimiert und lässt sich somit als universelles, tumorassoziiertes Antigen einsetzen. Vonderheide et al. beschrieben hTERT-spezifische Peptide mit Bindungsmotiven für MHC Klasse I-Antigene auf Tumorzellen. [53,54]

Minev et al fanden sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit Prostata Tumoren hTERT-spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten, die in der Lage waren, HLA-A2+ Zellen von Brust-, Darm- und Hautkrebstumoren zu lysieren. [55] Die Arbeitsgruppe stellt darüber hinaus die Vermutung auf, dass hTERT als universelle Impfung gegen Krebs eingesetzt werden könnte.

Diese vielversprechenden Forschungsansätze gaben den Anlass, in der vorliegenden Arbeit den Effekt intraperitoneal applizierter, synthetischer Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung von hTERT im humanisierten Harnblasentumor-Mausmodell zu überprüfen.

Während die AS-ODN-Monotherapie gegen das Target hTERT eine Verringerung der Tumorumfänge sowie eine Verlängerung des Überlebens erbrachte, erwies sich die Gabe von siRNA gegen hTERT als nahezu wirkungslos. Dabei ist zunächst zu bedenken, dass die Fallzahlen bei der Durchführung dieser Versuche

gering waren, so dass die Studien nur einen explorativen Charakter haben können.

Die unzureichende Wirkung der siRNA in den vorliegenden Untersuchungen konnte einer ungenügenden Aufnahme des Konstruktes in die Tumorzellen zu Grunde liegen, schließlich erfolgte die Applikation aller AS-ODN und siRNAs ohne Zugabe eines Carriers.

Grundvoraussetzung für die Inhibition einer Target-mRNA ist, dass die synthetischen Nukleinsäurekonstrukte die Zellmembran passieren und in die Zelle eindringen können. Diese negativ geladenen Konstrukte werden jedoch von Zellen nur in geringer Menge spontan aufgenommen. Durch die Verwendung bestimmter Trägerlipide konnte in anderen Studien eine Verbesserung der Aufnahme und eine für die Wirkung der Oligonukleotide günstigere intrazelluläre Verteilung erreicht werden. *In vitro* verwendete Transfektionsreagenzien wie z. B. kationische Lipide gehen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen stabile Komplexe mit den Nukleinsäuren ein, schleusen diese durch die negativ geladene Zellmembran und setzen sie im Zytoplasma oder Zellkern wieder frei. [56] Herbert et al. zeigten, dass die Kopplung eines Lipids an AS-ODN zu einer verbesserten Aufnahme sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führte [57]

Andere Studien dagegen belegen, dass die zelluläre Aufnahme von AS-ODN *in vivo* auch ohne Transfektion möglich ist. Duggan et al. beispielsweise konnten in einem *ex vivo*-Harnblasenmodell die effiziente Aufnahme von AS-ODN in das Epithel ohne Zugabe einer Transfektionsreagenz nachweisen. [58]

In bisherigen Studien zur *in vivo*-Applikation von siRNAs kamen überwiegend kationische Lipide als Transfektionsreagenz zum Einsatz. [59,60]

Gegen die Hypothese, dass die unzureichende Wirkung der siRNA durch eine ungenügende Aufnahme in die Zellen begründet ist, sprechen jedoch die Ergebnisse aus Vorversuchen. Fluoreszenz-mikroskopische Analysen konnten die *in vivo*-Aufnahme FITC-markierter siRNA in die untersuchten Tumorzellen bestätigen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die applizierten siRNAs auch ohne den Einsatz eines Carriers in die Tumorzellen eindringen konnten. [40]

Möglicherweise lässt sich der Unterschied in der antitumoralen Effektivität der beiden Therapeutika gegen hTERT durch den unterschiedlichen Wirkungsort von AS-ODN und siRNA erklären. AS-ODN wirken aufgrund der RNase H-Verteilung vorwiegend im Zellkern, während sich der für die siRNA-Aktivität wichtige RISC-Komplex im Zytoplasma befindet. [61] Dies schließt den Angriff nukleärer RNAs oder Introns durch siRNAs aus.

Die Effizienz der antitumoralen Aktivität von siRNAs und AS-ODN lässt sich schwer vergleichen, schließlich ist sie abhängig von unterschiedlichen Variablen, wie z.B. der Targetsequenz, der Transfektionseffizienz und dem Zelltyp. Vickers et al. verglichen siRNAs und AS-ODN gegen die gleichen Targetsequenzen und fanden ähnliche Effekte hinsichtlich der Effizienz, der Konzentrations- und der Zeitabhängigkeit der Konstrukte. [62] Lou et al. dagegen zeigten, dass die Targetreduktion durch AS-ODN stärker war als durch siRNAs. [63] Letztere Beobachtung bestätigte sich bei den tierexperimentellen Studien dieser Dissertation.

siRNAs können intrazellulär mehrfach wiederverwendet werden (Recycling). D.h. ein Antisense-Strang einer siRNA kann nach Hybridisierung und Targetspaltung im Komplex mit RISC ein neues Targetmolekül binden und spalten. Damit konnte begründet werden, dass sich häufig vergleichbare siRNA-Effekte in 100-1000fach geringeren Konzentrationen als bei AS-ODN fanden. [64,65]

Möglicherweise beruhte die Wirkung des AS-ODN gegen hTERT in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen auf Off-Targeteffekten. Off-Targeteffekte von AS-ODN sind einerseits durch Alterationen anderer Gene, andererseits durch eine Immunstimulation durch sogenannte CpG-Motive bedingt. Immunstimulatorische Wirkungen sind in diesem immundepletierten Mausmodell allerdings mutmaßlich zu vernachlässigen.

Off-Targeteffekte der siRNAs und AS-ODN sind konzentrationsabhängig. Im Zellkultursystem zeigten siRNAs weniger Nebeneffekte. Dies könnte jedoch mit der im Vergleich zu AS-ODN wesentlich geringeren Konzentration zusammenhängen. [66]

5.4 Survivin – ein Antitumortarget?

Survivin ist überexprimiert in den meisten Krebszellen. Dies trägt dazu bei, dass diese Zellen besonders resistent gegenüber apoptotischen Stimuli sind. Die Survivin-Antisense-Therapie zielt darauf, die Krebszellen durch Elimination der Survivin-Expression in die Apoptose zu treiben.

Die Mechanismen der antiapoptotischen Funktion von Survivin sind noch nicht vollständig erforscht. Marusawa et al. postulieren, dass die inhibierende Wirkung von Survivin auf die Apoptosekaskade über eine Inaktivierung der Zelltodprotease Caspase-9 vermittelt und von einem Kofaktor (HBXIP) abhängig ist. [27]

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2008 von Li et al. dagegen zeigt, dass Survivin keine direkte, hemmende Wirkung auf Effektor-Caspasen ausübt. [67]

Olie et al. entwickelten bereits im Jahre 2000 mehrere Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotide, die gegen unterschiedliche mRNA-Regionen des Survivins gerichtet waren. Gesucht wurde dann das AS-ODN, das die Survivin-mRNA-Transkription in den untersuchten Krebszellen am effektivsten mindern konnte. Hierfür eignete sich am besten das AS-ODN 4003, welches gegen die Nukleotide 232-251 der Survivin-mRNA gerichtet ist. Dabei konnte mit einer Konzentration von 400 nM eine maximale Downregulation von 70% der Survivin-mRNA erzielt werden. Die Therapie mit 4003 induzierte die Apoptose und führte zu einer Chemosensitivierung der behandelten Krebszellen gegenüber Etoposid. [68]

Fuessel et al. entwickelten im Jahre 2004 unterschiedliche AS-ODN-Konstrukte, die ebenfalls gegen unterschiedliche mRNA-Regionen des Survivins gerichtet waren. Es wurde dann der Effekt dieser Konstrukte auf vier verschiedene Blasenkarzinomzelllinien überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinie EJ28 durch SVV261, SVV264 und SVV286 in ihrer Lebensfähigkeit und Proliferation gehemmt werden konnte. Die Downregulation von Survivin in den Tumorzellen führte zu einem Zellzyklusarrest und zu einer gesteigerten Apoptose. [69]

Zwei Jahre später versuchten Fuessel et al., Survivin in den Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und 5637 herunterzuregulieren. Dies gelang durch den Einsatz des AS-ODN AS-SVV286 und der small interfering RNA si-SVV284. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die vorbehandelten Karzinomzellen im Vergleich zu Tumorzellen mit normaler Survivin-Expression ein größeres

Ansprechen auf anschließende Chemotherapien, bezogen auf Zellzahl und Anzahl der apoptotischen Zellen, zeigten. Zudem zeigte sich, dass die Survivin-Expression durch die siRNA effizienter gehemmt werden konnte als durch das AS-ODN. [70]

Im Rahmen dieser Dissertation sollte nun der therapeutische Effekt von AS-SVV286 und si-SVV284 im Tiermodell untersucht werden. Das AS-ODN zeigte dabei eine statistisch signifikante Verringerung der Tumorumfänge sowie eine Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere. Si-SVV284 dagegen zeigte keine Wirkung.

QPCR-Analysen der Target-mRNA-Expression in den Tumoren zeigten eine Reduktion der SVV-mRNA nach der Behandlung mit si-SVV284, so dass eine gestörte oder verringerte Aufnahme der siRNA als Ursache für den fehlenden therapeutischen Effekt unwahrscheinlich ist. [40] Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass diese molekularen Analysen nur stichprobenartig an jeweils einer Maus pro Gruppe erfolgten, so dass der Anspruch einer systematischen Analyse nicht besteht und Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

Eine mögliche Ursache für den fehlenden antitumoralen Effekt könnte eine Besonderheit im Survivin-Transportmechanismus sein. Nach seiner Produktion wird das Survivin in das Zytoplasma transportiert, was offensichtlich eine wichtige Rolle für seine antiapoptotische Funktion spielt. Survivin im Zellkern scheint weniger effektiv zu sein als solches im Zytoplasma. Bei einigen Patienten ist dieser Transport in das Zytoplasma allerdings gestört und das Survivin befindet sich vorwiegend im Zellkern. Erste Studien zeigen, dass diese Patienten bessere Überlebenschancen haben. [71,72] Es wäre denkbar, dass bei den Versuchstieren dieser Transport erhöht war, was den Tumoren trotz Therapie Wachstumsvorteile verschafft haben könnte.

Nicht begründet wäre hiermit jedoch die Beobachtung, dass das verwendete AS-ODN eine Wirkung zeigte, nicht jedoch die siRNA. Mögliche Erklärungen hierfür könnten jedoch, im Einklang mit den o.a. Erkenntnissen, der unterschiedliche Wirkungsort von siRNA und AS-ODN sowie eventuelle Off-Targeteffekte des AS-ODN sein.

5.5 VEGF – ein Antitumortarget?

Ziel der antiangiogenetischen Therapie ist es, die Gefäßversorgung und somit die Durchblutung eines Tumors zu hemmen. Die Anwendung des Prinzips der Anti-Angiogenese zur Behandlung maligner Tumore geht wesentlich auf die Forschungsarbeiten von Folkman zurück, der sich seit den 70iger Jahren intensiv mit den Themen Angiogenese und Anti-Angiogenese beschäftigt hat. [73,74]

Im Jahr 2004 wurde die erste Anti-VEGF-Tumorthherapie von der „Food and Drug Administration“ (FDA) zugelassen. Bei dem Wirkstoff Bevacicumab (rhuMAb-VEGF) handelt es sich um einen VEGF-neutralisierenden, monoklonalen Antikörper, der für die Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms in den USA und in der EU zugelassen ist. Bevacicumab wird zusätzlich zur konventionellen Chemotherapie verabreicht. Hurwitz et al. konnten zeigen, dass die Kombination der konventionellen Chemotherapie mit Bevacicumab bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom zu einer Verlängerung des Überlebens um 4,7 Monate führte. [75] Seit 2006 ist der Wirkstoff zusätzlich für die Therapie des metastasierten, nicht-kleinzelligen Lungenkrebses zugelassen. 2008 bekam er die Zulassung für die Therapie des Mammakarzinoms. Bevacicumab ist trotz diverser positiver Studien ein umstrittenes Medikament. So zählt es beispielsweise zu einem der teuersten Medikamente weltweit. Zudem weist der Antikörper beachtliche Nebenwirkungen wie Hypertonie und Blutungen auf, was dazu führte, dass sich nur weniger als die Hälfte der Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs für die Behandlung qualifizieren konnten. [76]

Sunitinib stellt einen weiteren VEGF-Inhibitor dar. Hierbei handelt es sich um einen Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, der als Arzneistoff zur Behandlung nicht resezierbarer und/oder metastatisch maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) sowie fortgeschrittener und/oder metastasierter Nierenzellkarzinome (MRCC) eingesetzt wird. Sunitinib ist ein potenter, selektiver Inhibitor von verschiedenen Proteintyrosinkinasen („Multitarget Inhibitor“) und wirkt über Hemmung der Rezeptoren von VEGF (VEGF-R -1, -2, -3) sowie PDGF (PDGFR-alpha, -beta). Dadurch kommt es zu einer gleichzeitig antiproliferativen und antiangiogenetischen Wirkung.

Motzer et al. konnten in einer klinischen Phase-III-Studie zeigen, dass Sunitinib im Vergleich zu Interferon- α bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom das progressionsfreie Überleben mehr als verdoppelte. Sunitinib führte außerdem bei 28% der Probanden zu einer Verkleinerung der Tumormasse. [77]

Mit VEGF-Trap (Aflibercept) befindet sich derzeit ein weiterer innovativer, biologischer VEGF-Inhibitor in der klinischen Prüfung. VEGF-Trap ist ein Fusionsprotein, das an die VEGF-Rezeptor-Familie bindet und ein neues antiangiogenetisches Therapiekonzept darstellt. Die Substanz hat eine hohe Spezifität für VEGF-A und bindet an alle VEGF-A Isoformen mit etwa 100-fach höherer Affinität als Bevacizumab. Außerdem bindet Aflibercept an VEGF-C und -D, welche die Neubildung der Lymphgefäße induzieren, sowie an den PlGF (Plazenta Growth Factor). Die Wirksamkeit von Aflibercept wird derzeit in diversen klinischen Studien überprüft. Seit März 2008 werden Patienten mit rezidivierenden, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen für eine klinische Phase-II-Prüfung dieses neuen Therapeutikums rekrutiert.

Die laufenden Einzelsubstanz-Studien mit Aflibercept werden durch ein umfangreiches Phase-III-Programm vervollständigt, in dem Aflibercept bei fünf verschiedenen fortgeschrittenen, soliden Tumorarten mit konventioneller Chemotherapie kombiniert wird. Sanofi-aventis plant bereits für 2008 die Einreichung der ersten Zulassungsanträge für VEGF-Trap. [78]

Angesichts vielversprechender Therapieaussichten sollte im Rahmen dieser Dissertation die Wirksamkeit von si-VEGF nach intraperitonealer Injektion im humanisierten Harnblasentumor-Mausmodell untersucht werden. Es konnte keine statistisch signifikante Reduktion des Tumolvolumens nachgewiesen werden. Auch eine Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere war nicht nachweisbar. Obwohl durch fluoreszenzmikroskopische Analysen die erfolgreiche *in vivo*-Aufnahme der FITC-markierten siRNA in die Tumorzellen gezeigt werden konnte, ging dies nicht mit einem Ansprechen des Tumorwachstums bzw. der Überlebenszeit einher. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass diese Analyse nur stichprobenartig an einer Maus erfolgte, so dass der Anspruch einer systematischen Analyse nicht besteht und Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

In Vorversuchen verringerte die *in vitro*-Transfektion von EJ28-Zellen mit si-VEGF865 die Anzahl der VEGF-Transkripte. Die Expression der VEGF-mRNA in den Tumorzellen konnte auf 22-34% reduziert werden. Die *in vitro*-Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass si-VEGF865 allein nicht in der Lage war, die Viabilität der Tumorzellen zu beeinflussen. Letztere Beobachtung bestätigte sich im Rahmen der tierexperimentellen Studien. Während die transfizierten Zellen *in vitro* bei einer anschließenden Therapie mit Mitomycin bzw. Cisplatin eine erhöhte Chemosensitivität aufwiesen, zeigte die Kombination von si-VEGF865 und Cisplatin im Tierversuch keinen statistisch signifikanten Effekt.

Die Therapieversuche mit einer Kombination synthetischer Nukleinsäurekonstrukte und Cisplatin erfolgten unter der Annahme, dass die Nukleinsäurekonstrukte eine Chemosensitivierung der Tumorzellen gegenüber Cisplatin verursachen könnten. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Behandlungserfolg könnte eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin sein.

5.6 Nukleinsäurebasierte Geninhibition – AS-ODN vs. siRNA

Es gibt mehrere Ansätze, die Proteinsynthese auf der Stufe der DNA oder RNA zu manipulieren. Antisense-Oligonukleotide beeinflussen die Proteinbiosynthese hauptsächlich auf der posttranskriptionellen Stufe. Dabei handelt es sich um einzelsträngige, kurze, chemisch veränderte Nukleinsäuren. Nur die homologen RNA-Stücke können Hybride mit den Oligonukleotiden bilden. So kann zumindest theoretisch ganz gezielt die Biosynthese eines einzelnen Proteins ausgeschaltet werden. Diese Strategie wurde erstmals 1978 im Zellkulturversuch angewendet.

Die Genexpression kann aber auch durch doppelsträngige, kurz-kettige RNA unterdrückt werden. Diese erst vor wenigen Jahren entdeckte Form des „gene-silencing“ wird als RNA-Interferenz bezeichnet. Die Wirkung, nämlich die

Unterdrückung der DNA-Transkription, ist ähnlich der von AS-ODN, der Mechanismus ist aber ein anderer.

Achenbach et al. zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit größer ist, effektive siRNA-Moleküle auszuwählen als AS-ODN-Konstrukte. [61] Während von sieben untersuchten AS-ODN-Konstrukten nur zwei eine effiziente mRNA-Reduktion bewirkten, waren vier von sechs getesteten siRNAs wirksam. [79]

Der Unterschied zwischen AS-ODN und siRNAs liegt in ihrem intrazellulären Wirkungsort. AS-ODN wirken aufgrund der RNase H-Verteilung vorwiegend im Zellkern, während sich der für die siRNA-Aktivität wichtige RISC-Komplex im Zytoplasma befindet. [61] Dies schließt den Angriff nukleärer RNAs oder Introns durch siRNAs aus.

Die Effizienz von siRNAs und AS-ODN lässt sich schwer vergleichen, schließlich ist sie abhängig von unterschiedlichen Variablen wie z.B. der Targetsequenz, der Transfektionseffizienz und dem Zelltyp. Vickers et al. verglichen siRNAs und AS-ODN gegen die gleichen Targetsequenzen und fanden ähnliche Effekte hinsichtlich der Effizienz, der Konzentrations- und der Zeitabhängigkeit der Konstrukte. [62]

Lou et al. dagegen zeigten, dass die Targetreduktion durch AS-ODN stärker war als durch siRNAs. [63]

siRNAs können intrazellulär mehrfach wiederverwendet werden. D.h. ein Antisense-Strang einer siRNA kann nach Hybridisierung und Targetspaltung in Komplex mit RISC ein neues Targetmolekül binden und spalten. Damit konnte begründet werden, dass sich häufig vergleichbare siRNA-Effekte in geringeren Konzentrationen als bei AS-ODN fanden. [64,65]

Off-Targeteffekte, d.h. unerwünschte Nebeneffekte der siRNAs und AS-ODN sind konzentrationsabhängig. [66] Im Zellkultursystem zeigten siRNAs weniger Nebeneffekte. Dies könnte jedoch mit der im Vergleich zu AS-ODN wesentlich geringeren Konzentration zusammenhängen.

	AS-ODN	siRNAs
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Verschiedene chemische Modifikationen in Abhängigkeit von der Anwendung möglich • Inhibition von Introns oder kernlokalisierter mRNA-Targets möglich • Einfache und kostengünstige Herstellung • Bekannte Pharmakokinetik <i>in vivo</i> • Effiziente Targetreduktion in geringen Konzentrationen • Intrazelluläres Recycling der Konstrukte 	<ul style="list-style-type: none"> • Effiziente Targetreduktion in geringen Konzentrationen • Intrazelluläres Recycling der Konstrukte
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Toxizität verschiedener Modifikationen • Off-Targeteffekte 	<ul style="list-style-type: none"> • Kernlokalisierte Targets oder Introns können nicht gehemmt werden • Unzureichend untersuchte Modifikationsmöglichkeiten • Keine Erfahrung aus klinischen Studien • Off-Targeteffekte • Kostenintensive Herstellung

Tabelle 10: Vor- und Nachteile von AS-ODN und siRNAs im Vergleich (modifiziert nach Scherer et al., 2003) [80]

Vergleichende Aussagen im Hinblick auf eine klinische Verwendbarkeit von siRNAs und AS-ODN können erst gemacht werden, wenn abgeschlossene klinische Studien verfügbar sind. Diese stehen für siRNAs zurzeit noch aus.

5.7 Ausblick

Die Entdeckung synthetischer Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung tumorrelevanter Gene eröffnet neue Wege in der Tumorthherapie. Weltweit wird derzeit intensiv an der Entwicklung dieser neuartigen Therapeutika geforscht.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag, indem Sie mit AS-SVV286 und ASt2331 zwei Therapeutika identifiziert hat, die im Tierversuch eine Verringerung der Tumorgroße und eine Verlängerung des Überlebens erzielen konnten.

Die Geron Corporation, ein amerikanisches Biotechnologie-Unternehmen, testet derzeit zwei Produkte, deren Angriffspunkt die Telomerase darstellt, in klinischen Studien am Menschen. Eines dieser Produkte, GRN163L, scheint effektiv bei der Behandlung diverser Krebsarten in Tierversuchen zu sein. [81,82] Dikmen et al konnten zeigen, dass T24-Blasenkarzinomzellen, welche für die Dauer von 24 Stunden mit GRN163L inkubiert worden waren, eine verminderte Telomeraseaktivität aufwiesen. Nach zweiwöchiger, kontinuierlicher Exposition mit GRN163L kam es zu einem G(0)/G(1)-Zellzyklusarrest. Die Tumorzellen hörten in der Folge auf, sich zu teilen. [83]

Geron rekrutiert zurzeit Probanden für klinische Phase I-Studien mit GRN163L. An Patienten mit Lungenkrebs, chronisch lymphatischer Leukämie und soliden Tumoren soll der neue Wirkstoff getestet werden. Die Ergebnisse dieser Studie stehen bislang noch aus.

Geron testet zusätzlich einen Telomerase-Impfstoff mit der Bezeichnung GRNVAC1 in klinischen Phase I- und II-Studien. Dabei werden dendritische Zellen aus dem Blut von Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom isoliert. Diese werden mit hTERT-mRNA inkubiert und schließlich unter die Haut der Patienten injiziert. Diese Immunzellen gelangen in die Lymphknoten und aktivieren dort zytotoxische T-Zellen, die wiederum Tumorzellen eliminieren, die Telomerase auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Patienten zeigten sowohl starke als auch spezifische Immunreaktionen. Zudem reduzierte sich bei 9 von 10 Probanden die Anzahl der im Blut zirkulierenden Krebszellen. [84,85] Dieser Impfstoff befindet sich derzeit für unterschiedliche maligne Erkrankungen in der klinischen Prüfung.

Das Pharmaunternehmen Lilly hat ein Antisense-Oligonukleotid namens LY2181308 entwickelt, welches Survivin blockieren soll. Rödel et al. haben kolorektale Karzinomzellen mit LY2181308 behandelt und diese Zellen anschließend mit 0-8 Gy bestrahlt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die AS-ODN-Therapie zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen und zu einer vermehrten Aktivität der Caspasen 3 und 7 in den Tumorzellen führte.

Zusätzlich setzten Rödel et al. ein Xenograft-Mausmodell mit den o.g. Tumorzellen ein, um den Effekt der AS-ODN-Therapie in Kombination mit der Bestrahlung *in vivo* zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die Kombinationstherapie zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums führte. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass die Behandlung mit LY2181308 die Ansprechrate der Radiotherapie bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen erhöhen könnte. [86]

Im Juli 2008 begann Lilly mit der Durchführung der ersten klinischen Phase I- und II-Studien mit LY2181308 an Patienten mit fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen. Ergebnisse hierzu werden nicht vor 2011 erwartet.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Harnblasenkarzinom stellt die zweithäufigste maligne urologische Tumorerkrankung dar. Zur Therapie des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms kommen Chemotherapeutika zum Einsatz, die starke Nebenwirkungen verursachen können bzw. ungenügende langfristige Effekte aufweisen. Durch die Untersuchung von tumorspezifisch exprimierten Faktoren, die an der Genese und Progression dieser Karzinomentität beteiligt sind, konnten geeignete Targets für eine neuartige Therapieoption auf Basis einer spezifischen Geninhibition identifiziert werden. Hierfür eignen sich synthetische Nukleinsäuren wie Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (AS-ODN) und small interfering RNAs (siRNAs). Potenzielle Targets stellen die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), Survivin und VEGF dar.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Versuch der Etablierung eines orthotopen, humanisierten Harnblasentumor-Mausmodells. Das Modell zeichnete sich jedoch durch eine geringe Tumoranwachsrate sowie schlechte Reproduzierbarkeit aus, so dass für die folgenden Interventionsstudien ein subkutanes, humanisiertes Harnblasentumor-Mausmodell etabliert wurde. Durch die subkutane Injektion von 5×10^6 Tumorzellen der Linie EJ28 im Flankenbereich der Versuchstiere konnte ein geeignetes Tumormodell für Folgestudien geschaffen werden.

Anschließend wurden hTERT, Survivin und VEGF als Targets einer nukleinsäurevermittelten Geninhibition mit AS-ODN und siRNAs im erfolgreich etablierten Tumormodell untersucht.

Die intraperitoneal applizierte AS-ODN-Monotherapie gegen die Targets Survivin und hTERT führte, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu einer Verringerung der Tumorumfänge sowie zu einer Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere. Die Veränderungen waren statistisch signifikant. Die Kombination der beiden AS-ODN mit Cisplatin führte zu keiner weiteren Tumorreduktion.

Die intraperitoneale Applikation von siRNAs gegen die Targets Survivin, hTERT und VEGF führte, verglichen mit der Negativkontrollgruppe, zu keiner statistisch signifikanten Reduktion des Tumorumfanges. Auch das Überleben konnte durch die Monotherapien nicht positiv beeinflusst werden. Durch die Kombination der

drei siRNAs mit Cisplatin konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung des Tumorzvolumens bzw. des Überlebens erreicht werden.

Die dargelegte Literatur und die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass durch eine spezifische Geninhibition unter Verwendung von AS-ODN gegen die Targets Survivin und hTERT eine Optimierung der antitumoralen Therapie, eine Minimierung des Einflusses der Behandlung auf gesunde Zellen und somit eine Reduktion von Nebenwirkungen möglich zu sein scheint.

Die therapeutische Wertigkeit der Inhibitoren, insbesondere in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika, sollte in nachfolgenden Experimenten, nach Möglichkeit unter Einsatz eines humanisierten, orthotopen Harnblasentumor-Mausmodells, genauer untersucht werden.

.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.**
Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008
- [2] **Metastasiertes Harnblasenkarzinom**
Jakse G, Stöckle M, Lehmann J, Otto T, Krege S, Rübben H
Dtsch Arztebl 104(15), 1024-8; 2007
- [3] **Praxis der Urologie, Band 2**
Jocham D, Miller K
Thieme Verlag, 3. Aufl., 105-66; 2007
- [4] **Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen**
**Harnblasenkarzinom. Empfehlungen zu Diagnose, Therapie und
Nachsorge**
Bichler et al.
2000
- [5] **Pathologie**
Böcker / Denk / Heitz
Urban & Fischer, 3. Auflage 870-874; 2004
- [6] **Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms**
vom Dorp F, Kausch I, Jocham D
Dtsch Arztebl 104(12), 797-802; 2007
- [7] **Correlation of cystoscopy with histology of recurrent papillary tumors
of the bladder**
Herr HW, Donat SM, Dalbagni G
J Urol 168(3), 978-80; 2002

- [8] **Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions**
Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, Kriegmair M, Hofstetter A, Knuechel R
Cancer 95(6), 1234-8; 2002
- [9] **Harnblasenkarzinom**
Rübben H et al
In: Rübben, Uroonkologie, Springer Verlag, 4. Auflage, 301-51; 2007
- [10] **A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage TaT1 bladder cancer: a metaanalysis of published results of randomized clinical trials.**
Sylvester R, Oosterlinck W, van der Meijden A
J Urol 171, 2186-90; 2004
- [11] **A systemic revue of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection vs. transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer**
Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, Mason MD
BJU Int 88, 209–16; 2001
- [12] **Improved local control of invasive bladder cancer by concurrent cisplatin and preoperative or definitive radiation. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.**
Coppin CM, Gospodarowicz MK, James K et al
J Clin Oncol 14(11), 2901-7; 1996
- [13] **The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial**
Skinner DG, Daniels JR, Russell CA, Lieskovsky G, Boyd SD, Nichols P, Kern W, Sakamoto J, Krailo M, Groshen S
J Urol. 145(3), 459-64; 1991

- [14] **Pharmakologie und Toxikologie**
Lüllmann H, Mohr K, Wehling M
Georg Thieme Verlag, 15. Auflage; 2002
- [15] **Tumour-inhibiting platinum complexes—state of the art and future perspectives**
Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK
Rev Physiol Biochem Pharmacol 146,1–53; 2003
- [16] **Cisplatin**
Trimmer EE, Essigmann JM
Essays Biochem 34, 191-211; 1999
- [17] **Examining the non-homologous repair process following cisplatin and radiation treatments**
Myint WK, Ng C, Raaphorst GP
Int J Radiat Biol. 78(5), 417-24; 2002
- [18] **Upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 confers the anti-invasive action of cisplatin on human cancer cells**
Ramer R, Eichele K, Hinz B
Oncogene 26(39), 5822-7; 2007
- [19] **Telomerase activity in human bladder cancer**
Lin Y, Miyamoto H, Fujinami K, Uemura H, Hosaka M, Iwasaki Y, Kubota Y
Clin Cancer Res 2(6), 929-32; 1996
- [20] **Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine.**
Heine B, Hummel M, Müller M, Heicappell R, Miller K, Stein H
J Pathol 184(1), 71-6; 1998
- [21] **The telomerase reverse transcriptase: components and regulation**
Nugent CI, Lundblad V
Genes Dev 12(8), 1073-85; 1998

- [22] **Telomeres and telomerase**
Blasco MA, Gasser SM, Lingner J
Genes Dev 13(18), 2353-59; 1999
- [23] **Actions of human telomerase beyond telomeres**
Cong Y, Shay JW
Cell Res 18(7), 725-32; 2008
- [24] **Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies.**
Charlesworth PJ, Harris AL
Nat Clin Pract Urol 3(3), 157-69; 2006
- [25] **Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.**
Altieri DC
Oncogene 22(53), 8581-9; 2003
- [26] **Validating survivin as a cancer therapeutic target**
Altieri DC
Nat Rev Cancer. 3(1), 46-54; 2003
- [27] **HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression**
Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC
EMBO J. 22(11), 2729-40; 2003
- [28] **Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer**
Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC
N Engl J Med. 341(6), 452-3; 1999
- [29] **Survivin--a universal tumor antigen**
Andersen MH, Thor SP
Histol Histopathol. 17(2), 669-75; 2002

- [30] **Antisense therapy for cancer**
Gleave ME, Monia BP
Nat Rev Cancer 5(6), 468-79; 2005
- [31] **Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis**
de Smet MD, Meenken CJ, van den Horn GJ
Ocul Immunol Inflamm 7(3-4), 189-98; 1999
- [32] **RNA-Interferenz: Grundlagen und beispielhafte Anwendung am Ki-67-Antigen**
Kausch I, Ewerdwalsesloh N, Sczakiel G, Jocham D
Onkologie heute 5, 10-15; 2004
- [33] **Phase-I Dosis-Eskalierungsstudie (akzeleriertes Titrationsschema) zur intravesikalen Rezidiv Prophylaxe mit dem Antisense-Oligonukleotid FFC15-01 bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase**
Steiner U, Lingnau A, Kausch I, Jocham D, Kurzidim H, Miller K
Abstract DGU Hamburg 2006
- [34] **Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer(MB49)**
Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A
Cancer Res 59, 2834-37; 1999
- [35] **Experimental investigations of the optimal therapy of systemic BCG infection in vivo**
Jurczok A, Zacharias M, Bohle A, Fornara P, Jocham D
Aktuelle Urologie 35(5), 406-12; 2004
- [36] **Optimal treatment of systemic bacillus Calmette-Guérin infection: investigations in an animal model**
Durek C, Jurczok A, Werner H, Jocham D, Bohle A
J Urol 168(2), 826-31; 2002

- [37] **A model of bladder tumor xenografts in the nude rat**
Oshinsky GS, Chen Y, Jarrett T, Anderson AE, Weiss GH
J Urol 154, 1925-9, 1995
- [38] **Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice**
Dinney CPN, Fishbeck R, Singh RK et al.
J Urol 154(4), 1532-8; 1995
- [39] **c-myc antisense oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of cisplatin in melanoma chemotherapy in vitro and in nude mice**
Citro G, D'Agnano I, Leonetti C, Perini R, Bucci B, Zon G, Calabretta B, Zupi G
Cancer Res. 58(2), 283-9; 1998
- [40] **Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo**
Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzler B, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP
Int J Oncol. 32(5),1049-56; 2008
- [41] **Similarity of serum-tumor pharmacokinetics of antitumor agents in man and nude mice.**
Kubota T, Inoue S, Furukawa T, Ishibiki K, Kitajima M, Kawamura E, Hoffman RM
Anticancer Res. 13(5A), 1481-4; 1993
- [42] **Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the subcutaneous tissue of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice.**
Taghian A, Budach W, Zietman A, Freeman J, Gioioso D, Ruka W, Suit HD
Cancer Res. 53(20), 5012-7; 1993

- [43] **Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts**
Johnsson A, Olsson C, Nygren O, Nilsson M, Seiving B, Cavallin-Stahl E
Cancer Chemother Pharmacol. 37(1-2), 23-31; 1995
- [44] **Cisplatin and Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer**
Marcu L, van Doorn T, Olver I
Acta Oncol. 42(4) ,315-325; 2003
- [45] **Use of a murine model for comparison of intravenous and intraperitoneal cisplatin in the treatment of microscopic ovarian cancer**
Mannel RS, Stratton JA, Rettenmaier MA, Liao SY, DiSaia PJ
Gynecol Oncol. 31(1), 50-5; 1988
- [46] **Direct diffusion of cis-diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy**
Los G, Mutsaers PH, van der Vijgh WJ, Baldew GS, de Graaf PW, McVie JG
Cancer Res. 49(12), 3380-4; 1989
- [47] **Drug resistance and the solid tumor microenvironment**
Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF
J Natl Cancer Inst. 99(19), 1441-54; 2007
- [48] **Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on tumor growth and angiogenesis in a xenograft model of human bladder cancer**
Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Horiguchi Y, Murai M
Hum Cell. 20(1), 1-9; 2007

- [49] **Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA**
Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW
Cell. 91(1), 25-34; 1997
- [50] **Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube**
Herrera E, Samper E, Blasco MA
The EMBO Journal 18, 1172–81; 1999
- [51] **Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells**
Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA
Nat Med. 5(10), 1164-70; 1999
- [52] **Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells**
Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO
Genes Dev. 13(18):2388-99; 1999
- [53] **The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes**
Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM
Immunity 10(6), 673-9; 1999
- [54] **Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy**
Vonderheide RH
Oncogene. 21(4), 674-9; 2002

- [55] **Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans**
Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(9),4796-801; 2000
- [56] **Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides**
Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK
Mol Pharmacol. 41(6), 1023-33; 1992
- [57] **Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition**
Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, Chin AC, Harley CB, Shay JW, Gryaznov SM
Oncogene 24, 5262-8; 2005
- [58] **Antisense Bcl-2 oligonucleotide uptake in human transitional cell carcinoma**
Duggan BJ, Cotter FE, Kelly JD, Hamilton PW, McCallion K, Harkin D, Gardiner T, Anderson N, Keane PF, Johnston SR, Williamson KE
Eur Urol. 40(6), 685-95; 2001
- [59] **Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer**
Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T et al.
Clin Cancer Res 10, 7721-6; 2004
- [60] **Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer**
Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S et al.
J Clin Invest 115, 978-85; 2005

- [61] **Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference**
Achenbach TV, Brunner B, Heermeier K
Chembiochem. 4(10), 928-35; 2003
- [62] **Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis**
Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF
J Biol Chem 278, 7108-18; 2003
- [63] **The reduction of Raf-1 protein by phosphorothioate ODNs and siRNAs targeted to the same two mRNA sequences**
Lou TF, Gray CW, Gray DM
Oligonucleotides 13, 313-24; 2003
- [64] **The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides**
Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G
Nucleic Acids Res 31, 4417-24; 2003
- [65] **Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells**
Miyagishi M, Hayashi M, Taira K
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 13, 1-7; 2003
- [66] **Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)**
Persengiev SP, Zhu X, Green MR
RNA 10, 12-18; 2004
- [67] **Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3**
Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W
Protein Sci. 2008 Jun 6. [Epub ahead of print]

- [68] **A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy**
Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U
Cancer Res. 60(11), 2805-9; 2000
- [69] **Systematic in vitro evaluation of survivin directed antisense oligodeoxynucleotides in bladder cancer cells**
Fuessel S, Kueppers B, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Meye A, Wirth MP
J Urol. 171(6 Pt 1), 2471-6; 2004
- [70] **Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA**
Fuessel S, Herrmann J, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Hakenberg OW, Wirth MP, Meye A
Cancer Lett. 232(2), 243-54; 2006
- [71] **Dynamic survivin in head and neck cancer: molecular mechanism and therapeutic potential**
Lippert BM, Knauer SK, Fetz V, Mann W, Stauber RH
Int J Cancer. 121(6), 1169-74; 2007
- [72] **Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of surviving**
Knauer SK, Krämer OH, Knösel T, Engels K, Rödel F, Kovács AF, Dietmaier W, Klein-Hitpass L, Habtemichael N, Schweitzer A, Brieger J, Rödel C, Mann W, Petersen I, Heinzel T, Stauber RH
FASEB J. 21(1), 207-16; 2007
- [73] **Angiogenetic factors**
Folkman J, Klagsbrun M
Science. 235, 442-7; 1987

- [74] **Fighting cancer by attacking its blood supply**
Folkman J
Sci Am. 275, 150-4, 1996
- [75] **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer**
Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F
N Engl J Med. 350(23):2335-42; 2004
- [76] **The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey**
Velcheti V, Viswanathan A, Govindan R
J Thorac Oncol. 1(5), 501; 2006
- [77] **Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma**
Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA
N Engl J Med. 356(2), 115-24; 2007
- [78] **Aflibercept: AVE 0005, AVE 005, AVE0005, VEGF Trap - Regeneron, VEGF Trap (R1R2), VEGF Trap-Eye**
No authors listed
Drugs R D. 9(4), 261-9; 2008
- [79] **Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X3 receptor**
Hemmings-Mieszczak M, Dorn G, Natt FJ, Hall J, Wishart WL
Nucleic Acids Res. 31(8), 2117-26; 2003

- [80] **Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA**
Scherer LJ, Rossi JJ
Nat Biotechnol. 21(12), 1457-65; 2003
- [81] **Oligonucleotide conjugate GRN163L targeting human telomerase as potential anticancer and antimetastatic agent**
Gryaznov SM, Jackson S, Dikmen G, Harley C, Herbert BS, Wright WE, Shay JW
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 26(10-12), 1577-9; 2007
- [82] **In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor**
Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE, Shay JW
Cancer Res. 65(17), 7866-73; 2005
- [83] **Telomerase targeted oligonucleotide thio-phosphoramidates in T24-luc bladder cancer cells**
Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW, Gryaznov SM
J Cell Biochem. 104(2), 444-52; 2008
- [84] **Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer**
Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J
J Immunol. 174(6), 3798-807; 2005
- [85] **Telomerase and cancer therapeutics**
Harley CB
Nat Rev Cancer. 8(3), 167-79; 2008

- [86] **Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models**

Rödel F, Frey B, Leitmann W, Capalbo G, Weiss C, Rödel C

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 71(1), 247-55; 2008

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Antisense
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxyribonukleotid(e)
BCa	Harnblasenkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2
bp	Basenpaare
CIS	Carcinoma in situ
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CpG	DNA-internes Dinukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
G	Gauge
HBXIP	<i>Hepatitis B virus x interacting protein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEJ	<i>homologous end-joining</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	<i>hypoxia inducible factors</i>
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
hTR	humane Telomerase RNA-Komponente
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen

mRNA	Boten (<i>messenger</i>)-Ribonukleinsäure
MVAC	Methotrexat Vinblastin Adriamycin Cisplatin
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NS	<i>Nonsense</i>
NS-si	non-silencing siRNA
ODN	Oligodesoxyribonukleotid(e)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDD	photodynamische Diagnostik
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PLK	<i>Polo-like kinase</i> (Protein)
RB1	retinoblastoma 1
QPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SA	Standardabweichung
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> (schwerer, kombinierter Immundefekt)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SVV	Survivin
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> (Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen)
TNM	Tumor Nodes Metastases
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> (Methode zur Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen)
TUR	transurethrale Resektion
TUR-B	transurethrale Resektion (Blase)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

XIAP *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

9 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Jocham für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Urologie durchführen zu können.

Ich danke Frau Dr. Caroline Blietz, Assistenzärztin der Klinik für Urologie, für die Betreuung und Unterstützung im Tierlabor, sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Daten.

Frau Beate Thode, MTA der Klinik für Urologie, danke ich für die Präparation der Tumorzellen und die Hilfe bei der Aufarbeitung der entnommenen Gewebe.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ingo Kausch, Oberarzt der Klinik für Urologie. Ich danke Dir für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, für Deine freundliche Unterstützung und Geduld, sowie für die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit publizieren zu können.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Vater, Dr. Werner Blumhoff. Du hast mich während meines Studiums und während der Erstellung dieser Dissertation bedingungslos unterstützt. Dafür danke ich Dir von Herzen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund, PD Dr. Georg Griesinger, bedanken. Ich danke Dir für Deine Unterstützung und Deine Anregungen während der Erstellung dieser Arbeit.

10 LEBENS LAUF

Name

Lena Blumhoff

Geburtsdatum

10.07.1982

Geburtsort

Eutin

**Schulbildung**

1989 – 1993 Theodor-Storm-Grundschule, Heiligenhafen
1993 – 2002 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Oldenburg i.H.
2002 Abitur

Hochschulausbildung

Seit 2002 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2004 Physikum
7/2005 Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für Urologie unter der
Leitung von Herrn PD Dr. Ingo Kausch
8/2006 Beendigung des experimentellen Teils der Promotion
2007 – 2008 Praktisches Jahr

- Innere Medizin: Curschmann-Klinik, Timmendorfer Strand
- Chirurgie: Sana-Klinken, Lübeck
- Wahlfach: Klinik für Hand-, Brust- und Plastische Chirurgie, Schön-Klinken, Neustadt

Frühjahr 2009 voraussichtlich 2. Staatsexamen

11 PUBLIKATIONEN

1. Poster-Publikationen

Ki-67 Antisense Oligonukleotide:

Aufnahme und Verteilung nach intravenöser und intravesikaler Gabe

Blietz CE, Kausch I, Blumhoff L, Kynast B, Doehn C, Jocham D

ExpU 2006, Kongress in Essen

Verfügbarkeit von FITC markierter siRNA nach systemischer Applikation im humanisierten Harnblasentumormodell

Blietz CE, Kunze D, Wuttig D, Fuessel S, Blumhoff L, Meye A, Kausch I, Wirth MP, Jocham D

Tagung der Vereinigung Norddeutscher Urologen 2006, Kongress in Berlin

Intravesically and systemically applied antisense therapy

Blietz CE, Kausch I, Blumhoff L, Kynast B, Doehn C, Jocham D

DGU 2006, Kongress in Hamburg

Gewinn des 3. Preises in der Kategorie „Posterpreise experimentell“

2. Paper-Publikationen

Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo

Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzler B, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP

Int J Oncol. 32(5),1049-56; 2008